Système microfluidique μLAS pour l'analyse de l'ADN résiduel : Application au diagnostic de la maladie de Huntington et à l'analyse de l'ADN circulant dans le sang

Rémi Malbec

▶ **To cite this version:**

Rémi Malbec. Système microfluidique μLAS pour l'analyse de l'ADN résiduel : Application au diagnostic de la maladie de Huntington et à l'analyse de l'ADN circulant dans le sang. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA de Toulouse, 2018. Français. NNT : 2018ISAT0001 . tel-01744797

HAL Id: tel-01744797
https://theses.hal.science/tel-01744797

Submitted on 27 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par :
Rémi Malbec

Le jeudi 11 janvier 2018

Titre :
SYSTEME MICROFLUIDIQUE µLAS POUR L'ANALYSE DE L'ADN RESIDUEL:
Application au diagnostic de la maladie de Huntington et à l'analyse de l'ADN circulant

---

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

Unité de recherche :

LAAS-CNRS

Directeur(s) de Thèse :
Aurélien Bancaud
Pierre Joseph
Thierry Leïchlé

Rapporteurs :

Valérie Taly
Xavier Gidrol

Autre(s) membre(s) du jury :

Pierre Cordelier
Vincent Dion
Josep Samitier Martí

Remerciements

Il est temps pour moi de clôturer ces trois années de thèse dont je garderai un souvenir très positif. A la sortie des bancs de l'école, réaliser une thèse a été l'occasion de dresser un bilan de mes compétences tout en continuant à apprendre, scientifiquement et humainement. Pendant trois ans, j'ai pu évaluer mes capacités à mener à bien un projet, avec mon bagage académique mais aussi mes qualités personnelles et mes défauts. Le choix de mon sujet a été motivé par l'opportunité d'appliquer une technologie brevetée et innovante à des problématiques biologiques concrètes. Je retiendrai que cette thèse aura été une stimulation quotidienne, un champ d'expérimentations et de propositions d'idées, alimenté au gré de réflexions et d'échanges avec des personnes souvent passionnées, toujours curieuses. Ainsi, je me considère chanceux d'avoir eu un sujet de thèse et un environnement de travail qui ont fortement contribué à mon implication et à ma réussite.

Remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ces trois années, représente une tâche immense, que je ne pense pas pouvoir accomplir sans ajouter un nouveau chapitre à ce manuscrit déjà trop volumineux. Je vais donc tenter de rester bref, en espérant que les non cités sauront me pardonner.

Avant toute chose, je remercie Pierre Joseph et Thierry Leïchlé, de m'avoir accordé leur confiance pour mener à bien ce sujet. Merci d'avoir toujours eu la porte ouverte pour discuter de mes travaux, et pour vos relectures et vos retours toujours pertinents. Je remercie Antoine Naillon, Sébastien Méance, Marius Socol, Olivier Liot, Vincent Picot, Cyril Renaut, Hubert Ranchon... et toute l'équipe MILE, anciennement N2IS pour leur accueil, et tous les bons moments qu'on a pu partager. Merci à Marc Fouet de m'avoir aidé à prendre mes marques à mon arrivée au laboratoire. Je remercie les équipes techniques du LAAS qui nous accompagnent au quotidien, avec efficacité dans nos fabrications et expérimentations ; notamment Charline Blatché et Sandrine Souleille de la plateforme de biologie et de microscopie ; Laurent Mazenq, Rémi Courson et Fabien Mesnilgrente pour leur support en salle blanche ; Xavier Dollat pour avoir toujours eu une solution astucieuse pour intégrer nos puces.

Remerciements

Merci à nos collaborateurs, Pierre Cordelier du CRCT, Vincent Dion de l'Université de Lausanne, Picometrics Technologies et leurs équipes respectives pour la facilité de nos échanges, de nos discussions et leur réactivité. Merci aux acteurs du projet OncoDevice, pour avoir intégré ma thèse à cette dynamique. Je tiens à remercier particulièrement les stagiaires qui ont travaillé sur notre projet, Fanny Mermet-Meillon, Louisa Boyer, Bayan Chami, et Huynh Hai Truc Ngo. Certains de leurs travaux peuvent d'ailleurs être retrouvés dans ce manuscrit.

La vie associative du LAAS étant aussi riche que diversifiée, merci aux collègues toujours motivés pour une partie de volley ou de rugby, Julie, Jérôme, Aliki, Aurore, Erwan…, aux organisateurs de la journée de ski du LAAS et aux membres de l'équipe corpo de tennis, Philippe, Christian, Alexandre, Nicolas, Laurent, Bertrand.

Je remercie Jean Cacheux, mon acolyte de pauses déjeuners et cafés entre deux galères de paillasse. Merci à Nicolas Milon pour avoir entretenu avec assiduité mes compétences de pongistes. Merci à Bayan Chami pour avoir tenté de corriger mon accent anglais, et pour m'avoir remis en question avec une constance indéfectible. Merci à Miléna du Manoir, pour avoir égayé la rédaction de ce manuscrit.

Merci à mon directeur de thèse, Aurélien Bancaud, pour avoir été impliqué quasi quotidiennement dans la supervision de ma thèse. Aurélien a su guider ma réflexion, tout en me laissant prendre mes propres décisions et faire mes propres erreurs. Merci de m'avoir encouragé lorsque les résultats étaient au rendez-vous et motivé pour les taches que j'ai pu trouver pénibles. Merci d'avoir toujours été disponible pour partager tes conseils et ton expérience sur le plan scientifique mais aussi humain… sans oublier tes spots de surf préférés, tes récits de réanimations cardiaques, les histoires du labo, même lorsque je connaissais toutes les péripéties après trois ans de radotage . Enfin merci d'avoir supporté ma ferveur tennistique et Federesque, et je ne te tiendrai finalement pas rigueur d'avoir supporté Nadal…

Evidemment, je ne peux pas finir sans remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mon choix de faire cette thèse, et veillé à ce que je puisse travailler dans des conditions sereines. En dépit de la distance, merci de représenter ce point d'ancrage où je sais que je peux toujours revenir si le besoin s'en fait sentir.

Table des matières

Remerciements 3

Table des matières 5

Introduction 9

Origine de l'étude 9

Organisation du manuscrit 10

Chapitre 1. Technologies pour l'analyse de l'ADN résiduel 13

1.1. L'ADN circulant, définition et lien avec le cancer 14

1.1.1. Définition de l'ADN circulant 15

1.1.2. ADN circulant et ADN tumoral circulant, les mécanismes de libération dans la circulation 15

1.1.3. De l'intérêt de la biopsie liquide, et plus particulièrement de l'échantillon sanguin ... 18

1.1.4. De l'intérêt du cfDNA et ctDNA parmi les autres biomarqueurs de la circulation 21

1.2. Approches, limitations et méthodes pour l'utilisation de l'ADN circulant comme biomarqueur du cancer 24

1.2.1. Une approche globale : la distribution en taille du cfDNA 24

1.2.1.1. Concentration et fragmentation de l'ADN circulant 24

1.2.1.2. DNA Integrity Index 25

1.2.2. Une approche ciblée : les altérations de séquence du ctDNA 26

1.2.3. Vers la standardisation des protocoles pré-analytiques (et analytiques) 28

1.3. Technologies pour l'analyse de l'ADN circulant 32

1.3.1. Mesurer la concentration du cfDNA : les techniques spectroscopiques et fluorimétriques 32

1.3.2. Mesurer la taille du cfDNA : les techniques électrophorétiques de séparation 34

1.3.2.1. L'électrophorèse capillaire 35

1.3.2.2. Amélioration de la sensibilité de détection 36

1.3.2.3. Les technologies microfluidiques d'électrophorèses 39

1.3.3. L'amplification par PCR pour la détection de l'ADN résiduel 44

1.3.3.1. Quelques éléments sur l'amplification par qPCR et son application au cfDNA 44

1.3.3.2. La PCR digitale 47

1.3.4. Les opportunités pour de nouvelles technologies microfluidiques de concentration pour l'analyse de l'ADN résiduel 50
1.3.4.1. La microfluidique et les laboratoires sur puce 50
1.3.4.2. Les techniques microfluidiques de concentration de l'ADN 51
1.3.4.2.1. Les méthodes de stacking 51
1.3.4.2.2. Les méthodes de focalisation par gradient 54
1.3.4.2.3. Les méthodes de capture 57
1.3.4.2.4. Autres techniques de concentration 60
Conclusion du chapitre 1 64
Références du chapitre 1 65
Chapitre 2. µLAS : un laboratoire sur puce pour l'analyse de l'ADN résiduel. 79
2.1. Principe de fonctionnement de µLAS 80
2.1.1. Une première innovation : la séparation d'espèces chargées sans matrice solide 80
2.1.1.1. De la difficulté de séparer de l'ADN sans matrice solide 80
2.1.1.1.1. Cas d'une particule chargée 80
2.1.1.1.2. Cas de l'ADN 81
2.1.1.2. De l'importance de la hauteur de l'ADN dans le canal 83
2.1.1.2.1. Chromatographie hydrodynamique et méthodes dérivées 84
2.1.1.2.2. Méthode de fractionnement par couplage Flux-Force 84
2.1.1.3. L'utilisation d'un fluide non Newtonien pour générer une force transverse à l'écoulement sous l'action de champs hydrodynamique et électrophorétique 85
2.1.1.3.1. Cas des fluides Newtoniens 85
2.1.1.3.2. Cas des fluides non Newtoniens 86
2.1.1.3.3. Expression de la force transverse pour un fluide non newtonien 87
2.1.1.4. La séparation par µLAS 91
2.1.2. Une seconde innovation : la concentration et la séparation simultanées de l'ADN 93
2.1.3. Présentation de la concentration sélective d'un 100 bp ladder 95
2.2. Développement et optimisation de µLAS pour l'analyse de l'ADN 97
2.2.1. Description du montage et de l'expérience de séparation par µLAS 97
2.2.2. Le design de la puce microfluidique 99
2.2.2.1. Le choix du matériau 100
2.2.2.2. Les dimensions du canal 101
2.2.2.2.1. La hauteur du canal 101
2.2.2.2.2. La largeur et la longueur du canal 101
2.2.2.3. La géométrie de la constriction 103

2.2.2.4. Puces à double canaux 105
2.2.3. La formulation du tampon 107
2.2.4. Les paramètres d'actionnement 109
2.3. Précisions analytiques de µLAS 111
2.3.1. La gamme de taille et les différents types d'acides nucléiques 111
2.3.2. La précision de l'analyse par µLAS 112
2.3.2.1. Mesure de la taille 112
2.3.2.2. Mesure de la concentration 113
2.3.3. Facteurs de concentration et sensibilité de µLAS 114
2.4. Comparaison de µLAS avec les systèmes d'électrophorèses commerciaux 117
Conclusion du chapitre 2 119
Références du chapitre 2 120
Chapitre 3. Vers la détection spécifique de séquences de l'ADN. 125
3.1. Principe de détection de séquences spécifiques 126
3.1.1. Détection par fluorescence en surface 126
3.1.2. Détection par fluorescence en volume 127
3.1.3. Principe de détection avec µLAS 129
3.2. Les premières preuves de concept 131
3.2.1. La séparation de l'ADN simple brin 131
3.2.2. Démonstration de la concentration sélective du complexe sonde-cible 132
3.2.3. Concentration du complexe avec différents ratio sondes/cibles 133
3.2.4. Les facteurs de concentration 135
3.2.5. La compatibilité avec de l'ADN extrait de plasma 137
Conclusion du chapitre 3 139
Références du chapitre 3 140
Chapitre 4. Application au diagnostic de la maladie de Huntington. 143
Conclusion du chapitre 4 176
Chapitre 5. Application à l'analyse de l'ADN circulant. 177
5.1. Analyse d'échantillons purifiés 178
5.1.1. Extraction de l'ADN plasmatique 178
5.1.1.1. Origine et conditionnement du plasma 178
5.1.1.2. Comparaison des méthodes d'extraction de cfDNA 178
5.1.2. Séparation d'ADN circulant par µLAS 180
5.1.3. Séparation d'ADN circulant par BIABooster 181

5.1.3.1. Présentation de la technologie BIABooster 182
5.1.3.2. Résultats de séparation d'ADN purifié 184
5.2. Manipulation directe du plasma sur puce pour l'analyse du cfDNA 186
5.2.1. Compatibilité de µLAS avec des échantillons plasmatiques 186
5.2.2. Influence du tampon de séparation sur le plasma 188
5.2.3. La digestion des protéines du plasma 191
5.2.4. Le marquage de l'ADN circulant dans le plasma 194
5.2.5. La séparation de l'ADN circulant dans le plasma 196
Conclusion du chapitre 5 198
Références du chapitre 5 199
Conclusion et perspectives. 201
Principaux résultats 201
Comparaison de µLAS avec les systèmes d'électrophorèses commerciaux 202
Limitations de µLAS 205
Perspectives de développement 206
Annexes 211
A. Fabrication des puces microfluidiques 211
A.1. Photolithographie optique 211
A.2. Gravure du silicium 211
A.3. Perçage des puces 212
A.4. Oxydation des puces 212
A.5. Encapsulation des puces 212
B. Caractéristiques des différentes puces utilisées pour nos travaux 214
C. DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids, Lab on a Chip 216

Introduction

Origine de l'étude

La biologie moléculaire de laboratoire moderne, telle qu'on la connait, est difficilement envisageable sans les techniques électrophorétiques, utilisées en routine pour purifier et analyser des acides nucléiques de tailles variables. D'abord mises en œuvre avec des gels d'amidon dans les années 1950, elles ont été considérablement améliorées au cours des années pour aboutir au format capillaire actuel. Ces développements ont ouvert la voie à l'ère de la génomique, ce dont atteste le procédé de séquençage de Sanger. Ce procédé est fondé sur le codage des bases terminales d'un fragment d'ADN en couleurs spécifiques, couplé à une mesure de taille par électrophorèse pour évaluer sa position génomique. Cette combinaison de modification physico-chimique et de séparation en taille conduit à la reconstitution d'une séquence d'ADN. Les développements successifs et l'automatisation des techniques de séquençage, couplés aux progrès de la bioinformatique, ont contribué à l'explosion de la génomique dans les années 2000 avec, comme point d'orgue, la publication de la séquence du génome humain en 2001. Nos travaux s'inscrivent dans le cadre de l'innovation pour l'analyse génétique, où l'on vise à développer des outils et des technologies pour accélérer l'analyse des informations du génome en intégrant des fonctions de séparation, de concentration et de détections spécifiques de séquences par exemple.

Ces travaux de thèse font suite à ceux menés par Hubert Ranchon au cours de sa propre thèse portant sur la séparation d'ADN sans matrice solide sur puce microfluidique[1]. Le procédé de séparation repose sur un actionnement hydrodynamique et électrique bidirectionnel dans une solution viscoélastique. Dans ces conditions opératoires, Hubert a montré que la migration de l'ADN était dépendante de sa taille. L'introduction d'une constriction dans le canal a aussi permis de provoquer la concentration des ADN et leur séparation simultanée. Ces découvertes ont fait l'objet de deux brevets pour la séparation (WO 2014020271 A1) et la concentration (WO 2016016470 A1) qui ont été licenciés à la société Picometrics Technologies à la suite d'un travail de maturation mené par Vincent Picot.

[1] Ranchon, H. Développement d'outils analytiques par et pour la microfluidique: caractérisation d'écoulements d'objets dissous et intégration d'un système de séparation sans matrice de biomolécules. (Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2013).

Logiquement, l'intégration de fonctions de concentration, de séparation et de détection dans une puce microfluidique permet l'analyse sensible de l'ADN. Ainsi nos travaux ont consisté à développer et optimiser cette technologie microfluidique, nommée µLAS (micro laboratoire pour la séparation et l'analyse de l'ADN), et démontrer son potentiel applicatif pour des problématiques biologiques telles que le diagnostic de la maladie de Huntington, ou l'analyse de l'ADN circulant dans le sang pour le diagnostic et le suivi du cancer.

Nos travaux de thèses ont été menés en collaboration avec Picometrics Technologies, avec la motivation d'établir des preuves de concept pouvant être ensuite transférées industriellement. Par exemple, l'intégration d'une fonction de détection de séquences spécifiques a fait l'objet d'un nouveau brevet (FR1756234). Nous avons également collaboré avec l'équipe de Pierre Cordelier du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT) et l'équipe de Vincent Dion de l'Université de Lausanne (UNIL), qui nous ont apporté leur expertise sur les problématiques biologiques et nous ont fourni des échantillons biologiques sur l'ADN tumoral circulant et la maladie de Huntington, respectivement. La fabrication de plusieurs générations de puces a été réalisée dans la salle blanche du LAAS. La préparation des échantillons et toutes les étapes pré-analytiques ont été développées et menées dans la plateforme de biotechnologie du LAAS, de même que l'observation avec la plateforme microscopie du LAAS.

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit abordera la problématique de l'ADN résiduel (ou ADN en faible concentration) et les challenges associés à son analyse, notamment en termes de sensibilité de détection.

Dans notre premier chapitre, l'exemple de l'ADN circulant dans le sang à très faibles concentrations nous permettra d'illustrer ces challenges. Après avoir défini l'ADN circulant et montré sa pertinence comme biomarqueur du cancer, nous nous intéresserons aux technologies utilisées pour son analyse, et discuterons de leurs limitations. Nous montrerons qu'une étape de concentration est souvent nécessaire pour atteindre des sensibilités de détection pertinentes. Les différentes méthodes de concentration de la littérature seront discutées afin de montrer qu'il existe des opportunités pour le développement de technologies.

Dans notre second chapitre, nous introduirons la technologie µLAS que nous avons développée pour l'analyse de l'ADN résiduel. Après avoir présenté les principes sur lesquelles reposent les fonctions de séparation et de concentration, nous exposerons les différents

développements qui ont été menés pour obtenir un système fonctionnel, robuste et performant. Afin d'évaluer la pertinence de µLAS pour l'analyse de l'ADN résiduel, ces performances seront mises en perspective par rapport aux technologies décrites dans le chapitre premier.

Dans notre troisième chapitre, nous présenterons les premiers résultats de développement de la fonction de détection spécifiques de séquences, dernière brique pour l'obtention d'un système d'analyse total. Cette fonction est notamment nécessaire pour la détection de mutations pouvant servir de biomarqueurs cancéreux. Nous montrerons que l'approche mise en place permet la détection de séquences directement en volume, par amplification du signal à bruit de fond constant. Ces résultats font l'objet d'un brevet (FR1756234).

Dans notre quatrième chapitre, nous chercherons à évaluer le potentiel applicatif de µLAS pour la mesure de fragments de séquences répétés à l'origine de la maladie de Huntington. Nous mettrons notamment à profit la sensibilité de µLAS pour proposer l'analyse d'échantillons faiblement amplifiés, une approche rarement mise en œuvre jusqu'à présent qui peut être considéré comme un cas d'ADN résiduel. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article qui a été accepté à la publication sous réserve de révisions par la revue *Nucleic Acids Research*.

Enfin dans notre cinquième chapitre, nous appliquerons µLAS à l'analyse de l'ADN résiduel circulant. Nous montrerons que notre technologie a la sensibilité nécessaire pour établir des profils de distribution en tailles et en concentration de l'ADN circulant sous son format microfluidique et particulièrement sous son format capillaire industriel développé par Picometrics Technologies. Par ailleurs, nous présenterons une approche qui consiste à minimiser les étapes de préparation de l'échantillon sanguin pour procéder à l'analyse du plasma sans extraction préalable de l'ADN.

Chapitre 1.

Technologies pour l'analyse de l'ADN résiduel

Exemple de l'ADN circulant dans les fluides biologiques et challenges technologiques associés

La taille de fragments d'ADN, leur concentration, ou leur séquence sont autant d'informations analytiques exploitables pour les cliniciens ou les spécialistes de biologie moléculaire. L'accès à cette information est d'autant plus difficile que la quantité d'ADN dans l'échantillon est faible. En pratique, la détection et la caractérisation de petites quantités ou résidus d'ADN requièrent des développements méthodologiques du côté des technologies de l'ingénieur et de la biologie moléculaire pour atteindre des niveaux de sensibilité adaptés.

Un parfait exemple d'ADN résiduel est l'ADN circulant dans les fluides biologiques, un biomarqueur pertinent pour le dépistage et le suivi du cancer. L'ADN circulant est en particulier présent dans la circulation sanguine à faibles concentrations. Son analyse, qui reste un défi technique, présente un potentiel inédit pour le suivi et la prise en charge des patients en oncologie. A travers cet exemple applicatif fort, nous présenterons les différentes techniques et technologies classiquement utilisées pour l'analyse de l'ADN circulant et nous discuterons de leurs limitations. Enfin nous tentons de montrer que des technologies microfluidiques innovantes ont le potentiel pour résoudre certaines limitations.

1.1. L'ADN circulant, définition et lien avec le cancer

Le cancer se caractérise par la prolifération anormale des cellules d'un tissu. La morphologie anormale des cellules cancéreuses est un indicateur du cancer directement observable par microscopie[1]. A l'échelle moléculaire, le cancer se manifeste par des altérations génomiques, telles que des mutations de la séquence ADN[2]. De fait, la tumorigénèse semble en partie être un processus séquentiel d'acquisition d'altérations génétiques, qui rythment la progression vers l'état pathologique. Cette progression par « vagues » peut être appréhendée comme une analogie de l'évolution Darwinienne, où des changements génétiques successifs confère des avantages pour la croissance d'une population de clones[3,4]. En 1971, Knudson émit l'hypothèse selon laquelle le cancer est le résultat d'une accumulation par « à coups » de mutations de l'ADN d'une cellule[5]. Il semblerait que les instabilités génétiques qui affectent les gènes contrôlant la prolifération cellulaire favorisent les premiers développements du cancer[6]. Ainsi, une première dérégulation des gènes de maintenance (c'est-à-dire des gènes responsables de la stabilité du génome) favorise dans un second temps l'apparition d'autres instabilités. Différentes classes de gènes de maintenance ont été identifiés et sont par exemple impliqués dans des mécanismes de réparation de l'ADN ou de contrôle d'étape du cycle cellulaire. Ces gènes de maintenance sont communément appelés oncogènes[7] ou gènes suppresseurs de tumeurs[8] selon qu'ils stimulent ou inhibent la division cellulaire et l'apoptose, respectivement.

Dès lors, l'ADN apparaît comme un biomarqueur de choix pour le dépistage de la maladie, le suivi de son évolution, et le suivi de l'apparition de résistances au traitement. La biopsie du tissu cancéreux est généralement privilégiée pour recueillir les cellules malades, et extraire leur ADN génomique pour analyse par séquençage. En effet, c'est un préalable indispensable pour annoter les tumeurs et leurs associer des marqueurs. Les marqueurs de la maladie peuvent être très variables d'un patient à un autre, et la mise en place d'une médecine personnalisée ou médecine de précision requiert la capacité à traquer les modifications de la séquence ADN[9]. En réalité, de récentes études ont montré qu'une grande hétérogénéité peut exister au sein d'une même tumeur[4]. Ainsi Gerlinger et al. ont montré des différences entre les cellules du tissu tumoral en fonction de leur localisation dans la tumeur, ces dernières présentant également des différences avec les cellules des tissus métastatiques. A la lumière de ces résultats, on peut conclure que la biopsie du tissu est peu adaptée pour le pronostic du cancer ; ce qui reviendrait à tenter de prédire le comportement d'une population dans le temps en s'intéressant à seulement quelques individus à un instant donné[10]. L'ADN, issu des cellules tumorales, et circulant librement dans le sang est une source d'information

indirecte mais pouvant être étudiée sans biopsie. Par conséquent il représente une alternative pertinente pour appréhender la variabilité spatiale et temporelle de la tumeur.

1.1.1. Définition de l'ADN circulant

L'ADN libre circulant dans le sang, cfDNA (pour « circulating free DNA » ou « circulating cell-free DNA »), est ainsi nommé car des fragments sont présents dans la circulation sanguine, libres de toute association avec des cellules ou des débris cellulaires[11]. La première observation de cfDNA dans le sang est rapportée par Mandel et Metais en 1948[12]. Cet ADN, issu des cellules des tissus, se retrouve dans la circulation à la suite de divers mécanismes de sécrétions et morts cellulaires qui seront décrits ci-après (Figure 1.1). En 1965, Bendich et al. émettent l'hypothèse que l'ADN tumoral, circulant dans le sang, favorise l'apparition de métastases et la propagation du cancer[13]. L'ADN tumoral circulant (ctDNA) est la sous-fraction de l'ADN circulant, issu des cellules tumorales, et porteur de modifications géniques ou épigénétiques (lorsque l'expression des gènes est fonction du contexte, c'est le cas des méthylations) souvent caractéristiques de la maladie (Figure 1.1). La distinction est importante dans la mesure où le choix du cfDNA ou ctDNA comme biomarqueur dépend de l'application visée. Il est intéressant de noter que l'ADN circulant a été en premier lieu utilisé pour tester le sexe des bébés dès 1997. En effet, Dennis Lo a réalisé que si les tumeurs pouvaient libérer de l'ADN dans la circulation, les fœtus le pouvaient également, d'où la présence de chromosomes Y dans la circulation des mamans porteuses de garçons[14]. Cette découverte a révolutionné le diagnostic prénatal qui est devenu non invasif pour le fœtus et sert aujourd'hui à tester les bébés pour le syndrome de Down par exemple[10].

1.1.2. ADN circulant et ADN tumoral circulant, les mécanismes de libération dans la circulation

La présence de cfDNA dans le sang dépend d'un équilibre entre plusieurs mécanismes biologiques de libération et d'élimination de l'ADN, affectant son temps de séjour dans la circulation. L'ADN peut être libéré dans le sang par sécrétion cellulaire. Toutefois ce mécanisme actif de libération est à l'origine d'une infime fraction du cfDNA et demeure peu compris[11,15]. L'ADN est principalement libéré dans le sang lors de la mort cellulaire. Des mécanismes de dégradation enzymatique, et de filtration par les reins et le foie, favorisent alors son élimination de la circulation. Ainsi le cfDNA a un temps de demi-vie court, pouvant varier de 15 minutes à quelques heures[16].

L'apoptose et la nécrose sont des mécanismes de mort cellulaire, principaux responsables de la libération de l'ADN dans la circulation (Figure 1.1). En général la nécrose est causée par des facteurs extérieurs à la cellule, tels que les infections, les traumatismes ou les contaminations par une toxine. La cellule passe par plusieurs états et finit par éclater, provoquant la libération du matériel cellulaire et de fragments d'ADN de tailles variables dans les tissus environnants. Des phagocytes interviennent alors pour éliminer ce matériel cellulaire, entrainant une forte réponse inflammatoire dans le tissu[16,17].

A l'inverse, la mort cellulaire programmée par apoptose est un processus contrôlé, où l'assimilation du matériel cellulaire par les macrophages limite l'inflammation. L'ADN issu de cellules apoptotiques est caractérisé par des fragments dont les tailles sont des multiples de 180 paires de bases (bp) – 180 bp correspondant à la taille d'un nucléosome, après coupure entre deux nucléosomes par les endonucléases[17,18]. Par conséquent, l'étude de la fragmentation du cfDNA peut renseigner sur le mécanisme à l'origine de sa libération et plusieurs études tendent à supporter la thèse selon laquelle l'apoptose est à l'origine de la majorité du cfDNA dans le sang[19–21].

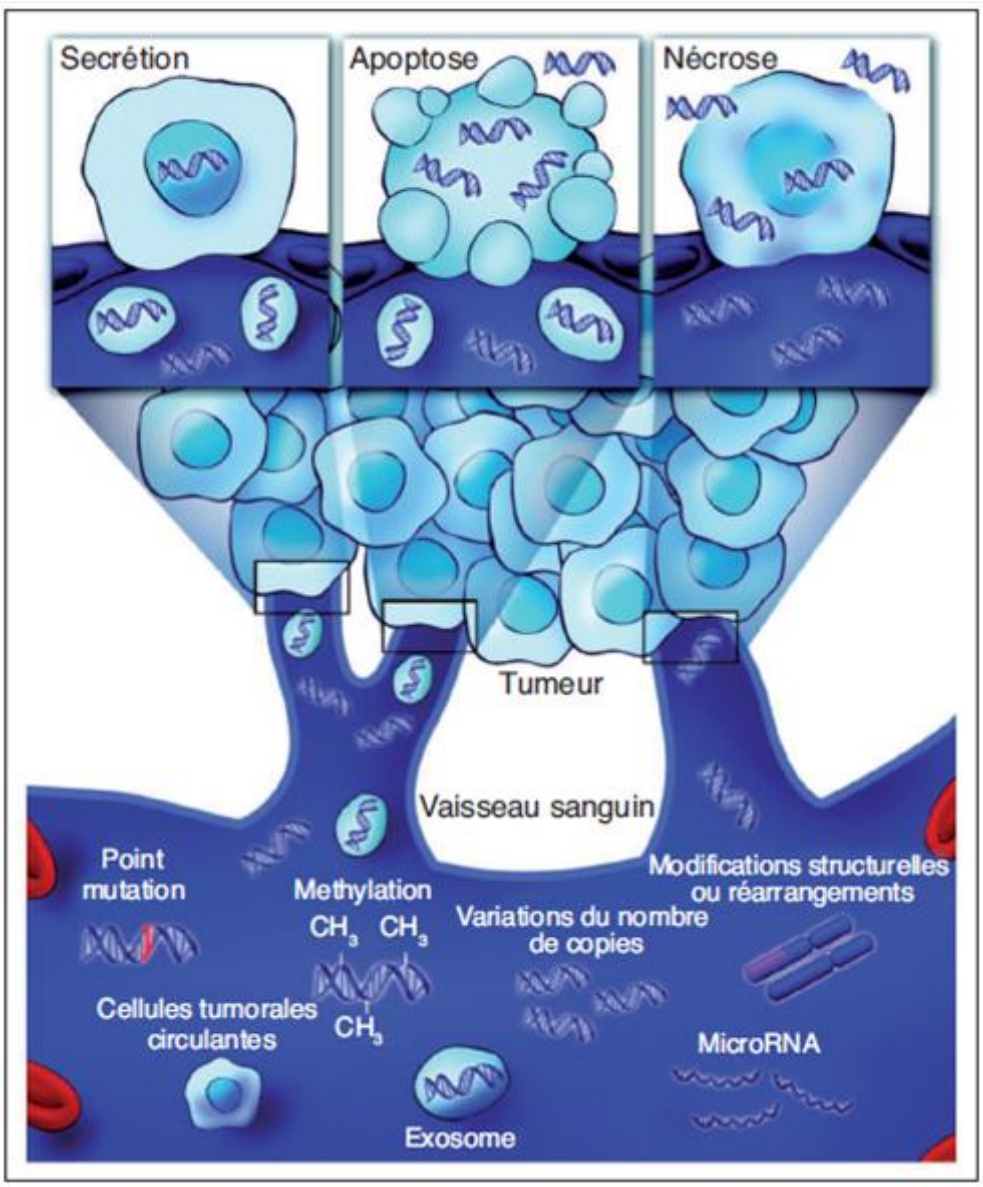


Figure 1.1. Les mécanismes de libération de l'ADN tumoral dans la circulation. Les altérations génétiques et épigénétiques associées au cancer sont détectables dans l'ADN libre circulant. En dehors de l'ADN, d'autres biomarqueurs cancéreux tels que les cellules tumorales, les exosomes et les micro-ARNs sont présents dans la circulation. Tiré de Diaz et Bardelli[17].

Le ctDNA présente des altérations caractéristiques de la cellule tumorale dont il est issu[17,20–22] (Figure 1.1). Le processus de libération du ctDNA dans la circulation présente quelques spécificités. Par exemple, dans le cas d'une tumeur, le renouvellement cellulaire dans le tissu cancéreux est plus important. Par conséquent, le nombre de cellules tumorales entrant en apoptose et nécrose augmente, résultant en une augmentation de la libération du ctDNA[11,19]. De plus, dans le tissu tumoral, l'élimination des débris apoptotiques et nécrotiques par les phagocytes est peu efficace, provoquant l'accumulation des débris cellulaires et favorisant la libération du ctDNA dans l'organisme[16,19]. Jahr et al. ont trouvé que le ctDNA pouvait représenter entre 3 % et 97 % de la part totale de l'ADN circulant[19]. En réalité ces fractions ont été mesurées chez des patients à des stades

avancés de la maladie. A un stade précoce le ctDNA représenterait plutôt moins d'1 % du cfDNA[17,20–24]. En outre, l'apoptose et la nécrose des cellules tumorales contribuent à endommager les cellules saines des tissus périphériques à la tumeur et à libérer du cfDNA. La localisation de la tumeur, sa taille et sa vascularisation sont autant de facteurs pouvant avoir une incidence sur la libération de l'ADN dans la circulation sanguine, et expliquer les différences en concentrations en cfDNA et ctDNA observées[17]. Les cellules tumorales circulantes (CTCs) sont les cellules issues du tissu cancéreux et libérées dans la circulation. Sur leur rôle dans la présence de ctDNA, les conclusions divergent, les technologies étant limitées pour la mesure de ces deux biomarqueurs. Ainsi Koyagani et al. ont trouvé une corrélation entre le nombre de CTCs et la méthylation du cfDNA[25]. A contrario, sur une cohorte de 640 patients souffrant de divers types de cancers, Bettegowda et al. ont relevé la présence de ctDNA en l'absence de CTCs chez une majorité d'entre eux[22], suggérant que le ctDNA n'est généralement pas dérivé des CTCs. Pour donner un ordre d'idée, environ 10000 cellules tumorales par millilitre de sang – un nombre de CTCs jamais observés dans la circulation – seraient nécessaires pour sécréter les niveaux de ctDNA observés dans la circulation[11]. Afin de collecter le cfDNA, le ctDNA et les CTCs dans les fluides biologiques, la biopsie liquide est la technique privilégiée.

1.1.3. De l'intérêt de la biopsie liquide, et plus particulièrement de l'échantillon sanguin

La biopsie liquide est ainsi nommée par opposition à la biopsie classique, cette dernière étant réalisée sur un tissu biologique solide. Les fluides biologiques concernés sont majoritairement le sang et ses dérivés, comme le plasma[12,19,20] et le sérum[25,26], mais du ctDNA et d'autres biomarqueurs ont aussi été détectés dans la salive[27–30], l'urine[31], le liquide cérébro-spinal[32,33], les selles[34,35] et dans une moindre mesure, le liquide d'épanchement pleural[36]. La biopsie liquide présente de nombreux avantages par rapport à la biopsie classique. Tout d'abord, le prélèvement est non invasif – une simple prise de sang par exemple – ce qui le rend pratique, rapide et répétable. A l'inverse, le tissu tumoral peut être difficile ou hors d'accès, accroissant les coûts des soins et pouvant être la cause de complications cliniques[16,17] (Figure 1.2). Par exemple dans le cas du myélome multiple, le suivi de la maladie nécessite des ponctions répétées très invasives des cellules de la moelle osseuse. Pour le confort du patient, il est impossible de proposer ces prélèvements plus d'une fois par an, limitant la détection précoces des rechutes[37]. En dehors des difficultés de prélèvement, la conservation des échantillons peut être problématique. Le tissu tumoral est généralement conservé congelé ou en blocs fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE), cette dernière méthode pouvant dénaturer l'ADN et le rendre impropre pour l'analyse moléculaire. Ce n'est pas le cas pour l'échantillon de biopsie

liquide, généralement frais et dénué de conservateurs. Dans le cas de tissus prélevés par aspiration à l'aiguille fine, les quantités d'échantillons sont souvent trop réduites pour la multiplication des analyses moléculaires[17,22]. Cependant, avec un prélèvement localisé, la biopsie classique peut difficilement refléter toute l'hétérogénéité du tissu tumoral et métastatique du patient, caractéristique des cancers[4]. A priori, la biopsie liquide a le potentiel pour appréhender la diversité génétique de la maladie. De plus, les prélèvements peuvent être régulier, et permettre de suivre les changements moléculaires dans le temps. De notre point de vue, des études doivent être menées pour confirmer que toutes les cellules du tissu tumoral libèrent leur ADN de façon identique dans la circulation. Pour cela, il faudrait être capable de séquencer individuellement toutes les cellules de la tumeur à la recherche de marqueurs, spécifique des cellules tumorales, et pouvant être retrouvés dans la circulation.

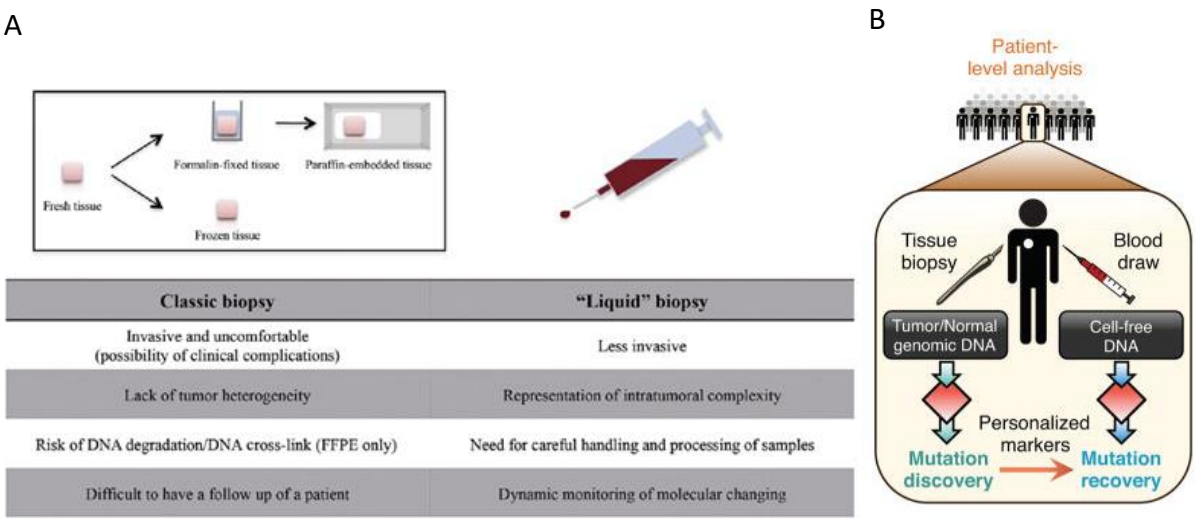


Figure 1.2. A) Comparaison des biopsies "liquides" avec les biopsies classiques. L'annotation du tissu tumoral à la recherche de mutation est effectuée en routine en oncologie. Cependant la collecte du tissu peut s'avérer difficile et inconfortable pour le patient. Les tissus sont le plus souvent congelés ou fixés en bloc FFPE, une procédure qui peut dénaturer l'ADN et le rendre impropre à l'analyse. Enfin un fragment de tissu peut difficilement être représentatif de l'hétérogénéité de la tumeur et de son évolution dans le temps. A l'inverse la biopsie liquide est peu invasive, et plus représentative de la tumeur. B) La biopsie du tissu peut être utilisée pour repérer des altérations génomiques qui seront retrouvées et suivies régulièrement dans le sang. Adapté de Zonta et al.[16] et Newman et al.[23].

Historiquement, l'échantillon sanguin est très utilisé par les biologistes pour leurs analyses et leurs études. Il est souvent utilisé sous forme de plasma, après élimination des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes par centrifugation ; ou sous forme de sérum si l'on provoque la coagulation avant la centrifugation pour éliminer aussi les facteurs de coagulation et le fibrinogène. Le sérum contient 2 à 24 fois plus de cfDNA que le plasma[38], une cause probable à ce phénomène étant la lyse des cellules immunitaires pendant l'étape de coagulation avant centrifugation. Le plasma est par conséquent une meilleure source de ctDNA, plus représentative du cancer[39]. L'intérêt

principal de l'échantillon sanguin réside dans le fait que la majorité des types de cancers libèrent des biomarqueurs dans le sang, mais pas forcément dans les autres fluides biologiques. Ainsi Wang et al. ont détecté du ctDNA dans le sang de 86% à 100% de leurs patients atteints de divers cancers contre une détection dans la salive dans 47% à 70% des cas. A l'inverse pour les patients présentant des tumeurs dans la cavité orale, de l'ADN tumoral a été détecté dans la salive dans 100% des cas, contre 80% des cas dans le sang[27]. De même, le ctDNA issu de tumeurs de cerveau et de la moelle épinière est présent dans le liquide cérébrospinal mais très peu dans le sang[40]. Pour expliquer ce phénomène, Bettegowda et al. ont émis l'hypothèse que la barrière hémato-encéphalique fait obstacle au passage du ctDNA dans la circulation[22]. Ainsi la localisation de la tumeur ou de la lésion métastatique semble avoir une influence sur l'abondance du ctDNA dans les différents fluides biologiques. En ce qui concerne l'utilisation de la salive, elle peut être considérée comme plus simple, moins invasive et source de moins d'anxiété chez le patient que pour le prélèvement sanguin, plus long et plus dépendant du protocole de prélèvement et de conservation[28,30]. Dans l'urine, de l'ADN génomique, issu du sang et de taille <70kDa et équivalent à environ 100 bp, est filtré par les reins et appelé trans-rénal ADN (tr-DNA)[41]. Cependant il n'y a pas de corrélation établie entre la concentration en ctDNA dans le sang et dans l'urine[42]. De plus, l'hydrolyse de l'ADN par la DNase I est 100 fois plus importante dans l'urine que dans le sang, ayant pour résultat la fragmentation importante de l'ADN, notamment autour de 29bp[43]. En ce qui concerne le liquide d'épanchement pleural, il est plutôt adapté pour le diagnostic des cancers du système respiratoire. Finalement, pour une détection optimale du ctDNA, les études menées présument de l'importance du choix du fluide biologique en fonction de la localisation anatomique de la tumeur[41] (Figure 1.3). Dans nos travaux et notre revue bibliographique, nous nous sommes principalement intéressé à l'échantillon plasmatique, dans l'optique de développer une technologie pour l'analyse du cfDNA et ctDNA applicable à plusieurs types de cancers, et comparable avec la majorité des études menées et des technologies utilisées.

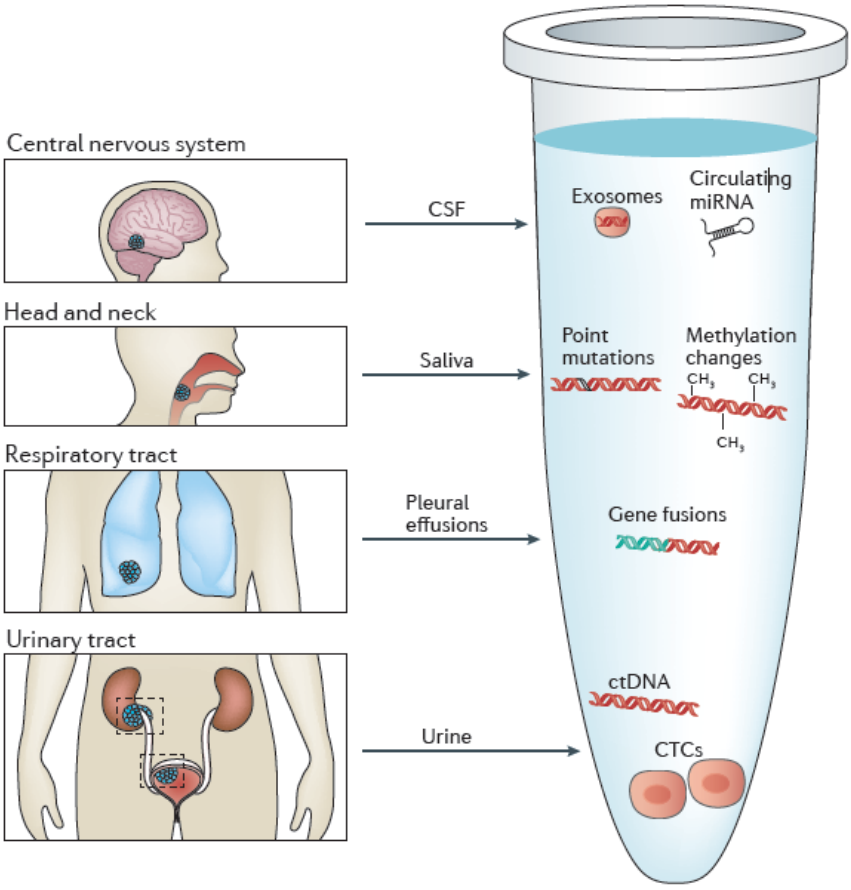


Figure 1.3. Les différents fluides biologiques pouvant servir de biopsie liquide. En dehors du sang, on retrouve des biomarqueurs du cancer dans la salive, l'urine, le liquide cérébrospinal, et les effusions pleurales. La quantité de biomarqueurs dans chaque fluide biologique dépend de la localisation de la tumeur. Tiré de Siravegna et al.[41].

1.1.4. De l'intérêt du cfDNA et ctDNA parmi les autres biomarqueurs de la circulation

En dehors de l'ADN, plusieurs objets dérivés des tumeurs peuvent être utilisés comme biomarqueurs cancéreux (Figure 1.3). Un grand nombre de travaux s'est intéressé aux cellules tumorales circulantes. Les CTCs sont issues de la tumeur primaire ou des lésions métastatiques avant d'être libérées dans la circulation sanguine. Leur découverte en 1869 par le physicien Thomas Ashworth est antérieure à celle du ctDNA[44] mais il a fallu attendre les années 1990 pour que l'on prenne la pleine mesure de leur potentiel applicatif[45]. Les CTCs peuvent être présentes dans le sang, isolées ou sous forme d'agrégats, et à une concentration très faible (~1 cellule tumorale pour 10^9 cellules du sang) qui varie en fonction du type de tumeur[46]. Par ailleurs, comme pour le ctDNA, la présence de CTCs a été associée avec le suivi de l'évolution du cancer après traitement[47]. Pour leur étude, les CTCs sont généralement triées des autres cellules présentes dans la circulation en fonction de caractéristiques biophysiques ou membranaires spécifiques[48]. La discrimination des CTCs peut se

faire en fonction de leurs tailles par exemple, supérieures en moyenne à celle des cellules sanguines, même si le rendement varie suivant les procédés de séparation[49]. Si les CTCs peuvent être analysées directement après isolation, la possibilité de les cultiver in vitro et in vivo (après xenogreffe par exemple) est particulièrement séduisante[50]. Par exemple, cela permet de tester l'efficacité de plusieurs molécules thérapeutiques sur une même modèle cellulaire, et de faciliter le développement de médecines personnalisées[41].

Un autre biomarqueur du cancer sont les exosomes, découverts en 1983 par Pan et Johnstone[51]. Ces vésicules extracellulaires, dont la taille varie entre 40 et 100 nm sont libérés dans les fluides biologiques par plusieurs types de cellules. Les exosomes sont généralement extraits des fluides biologiques par centrifugation à gradient de densité, ultracentrifugation, ou isolés en utilisant des protéines membranaires spécifiques[52,53]. Les exosomes circulent dans le sang d'une cellule à une autre et semblent être impliqués dans la communication intercellulaire[52,53]. En effet, ces vésicules contiennent des protéines, de l'ADN, de l'ARN messager (mRNA) et des micro ARNs (miRNA), capables de moduler l'activité des cellules réceptrices[52,53]. Certaines études tendent à montrer que les exosomes issus de cellules tumorales sont impliqués dans la propagation de la maladie en stimulant l'angiogénèse et en favorisant l'apparition de métastases[54]. Le matériel moléculaire encapsulé par les exosomes issus de cellules tumorales peut être utilisé comme biomarqueur du cancer, notamment par l'analyse du mRNA présent en son sein en grande concentration[55]. Toutefois, l'utilisation des CTCs et des exosomes comme biomarqueurs du cancer nécessite généralement l'extraction préalable du matériel génétique pour analyse, une méthode bien moins directe que l'utilisation du ctDNA.

Les ARNs circulants ont été observés dans le sang de patients atteints de mélanomes en 1996[56]. La présence de mRNAs peut renseigner sur les niveaux d'expressions de gènes (quand l'ADN ne le permet pas), à l'origine d'altérations épigénétiques, et impliqués dans le développement du cancer. Les miRNAs représentent la proportion la plus importante de cfRNA dans la circulation. On les retrouve dans les exosomes[57], les corps apoptotiques, ou encore en complexes avec des protéines[58] et leurs profils dans le sang semblent corréler avec leurs profils dans le tissu tumoral dont ils sont issus[59]. Toutefois, la plupart des analyses de mRNA et miRNA dans le sang sont encore à l'état exploratoire et la multiplication des études cliniques avec des protocoles standardisés est nécessaire pour valider leur potentiel clinique[60,61].

Enfin, le développement des technologies protéomiques a permis l'interrogation systématique de protéomes complexes et l'identification de protéines et de leurs niveaux d'expression dans les cellules, les tissus et les fluides biologiques, pour servir de biomarqueurs du

cancer[62] . Toutefois, la corrélation entre l'expression protéique dans les tissus cancéreux et leur concentration dans le sang reste souvent peu décrite. En effet très peu de biomarqueurs protéiques trouvés dans les tissus ont été validés dans le sang, probablement en raison de l'hétérogénéité du tissu tumoral. Ainsi des protéines très exprimées dans les tissus tumoraux peuvent avoir un taux de présence dans la circulation négligeable vis-à-vis de la masse de protéines libérées par les tissus sains. A l'inverse, les taux de protéines exprimées dans le tissu tumoral peuvent être identiques à ceux des tissus sains tandis que le renouvellement plus important des cellules dans le tissu tumoral conduit à une libération plus importante de ces dernières dans la circulation, à un ratio non représentatif de leur profil dans la tumeur[63]. En outre, une inflammation du tissu peut être à l'origine d'une expression protéique plus importante et la discrimination entre une pancréatite et un cancer du pancréas n'est pas toujours évidente. Parmi la masse des protéines du protéome, il faut être capable d'identifier le ou les biomarqueurs protéiques les plus pertinents, le moins possible corrélés à des facteurs extérieurs à la maladie, tels que l'âge ou le sexe du patient, ou les diverses pathologies dont il peut souffrir. D'où la nécessité d'investiguer rigoureusement la corrélation entre l'expression protéique, la libération dans la circulation et son élimination avec des méthodes de collection, de stockage et des pratiques expérimentales standardisées. En dépit de ces obstacles, plusieurs tests basés sur des protéines circulantes se sont avérés être des succès. Le diagnostic du cancer de la prostate et son suivi peut être réalisé par la détection d'un antigène prostatique spécifique (PSA) dans le sérum et le plasma, même si son utilisation pour le dépistage en routine reste discutée[64,65]. Des antigènes sont également proposés pour suivre la réponse au traitement et les rechutes dans le cas des cancers des ovaires, du pancréas et du colon[66]. Une autre approche prometteuse pour le diagnostic précoce du cancer consiste à s'intéresser à la réponse du système immunitaire, généralement amplifiée et donc plus facilement détectable, en ciblant les anticorps contre les antigènes cancéreux[62].

L'analyse du cfDNA et du ctDNA représente une alternative de choix dans la mesure où de nombreuses pathologies n'ont pas de marqueurs protéiques ou à l'inverse des marqueurs protéiques non spécifiques, sources de faux positifs. Par exemple, une corrélation a été montrée entre les taux de cfDNA et les marqueurs protéiques des cancers de la prostate[67], du colon[68] et du sein[69]. Par ailleurs, des études ont trouvé la détection du ctDNA plus sensible que la détection de biomarqueurs protéiques ou de CTCs pour le suivi du cancer du sein[69] et de l'intestin[22]. Cependant l'utilisation du cfDNA est loin d'être dénuée de challenges, relatifs à la standardisation des protocoles, à la concentration très faible du cfDNA dans la circulation et à la sous fraction que représente le ctDNA dans la masse du cfDNA.

1.2. Approches, limitations et méthodes pour l'utilisation de l'ADN circulant comme biomarqueur du cancer

Deux approches se dégagent pour l'utilisation de l'ADN circulant comme biomarqueur du cancer, en fonction du niveau d'information désiré et de l'application. Une approche globale consiste à utiliser le profil du cfDNA, c'est-à-dire à s'intéresser à sa charge (ou concentration) dans le sang et sa fragmentation. Une approche plus ciblée est de s'intéresser aux modifications génétiques et épigénétiques du ctDNA. Quelle que soit l'approche choisie, une limitation principale à l'utilisation de l'ADN circulant est sa très faible concentration dans le sang. Ainsi son analyse fine nécessite de recourir à des techniques pour amplifier ou concentrer le matériel cible et des technologies de détection sensibles.

1.2.1. Une approche globale : la distribution en taille du cfDNA

A ce stade de notre revue, il nous semble important de rappeler que le potentiel d'utilisation de la distribution en taille du cfDNA comme un biomarqueur du cancer reste à confirmer. Le développement de technologies d'analyse du cfDNA en routine doit faciliter l'acquisition d'un nombre suffisants de données fiables pour confirmer cette hypothèse.

1.2.1.1. Concentration et fragmentation de l'ADN circulant

Comme cela a été précisé plus tôt, le temps de demi-vie de l'ADN dans la circulation est très court et sa concentration dépend d'un équilibre entre des mécanismes de libération et d'élimination. En cas de cancer, un déséquilibre peut favoriser le mécanisme de libération et conduire à des concentrations élevées de cfDNA dans la circulation. Ainsi la charge en cfDNA est un biomarqueur potentiel pour la détection et le suivi du cancer, et plusieurs études tendent à confirmer cette corrélation[67–70]. Les mesures de concentration de cfDNA dans le plasma varie généralement de non détecté à 100 ng/mL chez les individus sains et de non détecté à 1000 ng/mL chez les patients souffrant de cancer[19,71]. Il est intéressant de noter que cette tendance se retrouve dans le sérum[72–74] où nous avons vu que la concentration en cfDNA est généralement plus élevée que dans le plasma[38]. Cependant, si une partie du cfDNA dans le sérum provient de la lyse des cellules immunitaires lors de la coagulation, on peut penser que les différences de concentration entre individus malades et sains sont moins marquées que dans le plasma. Toutefois, pour Jahr et al., cette corrélation n'est pas

toujours évidente dans la mesure où ils ont obtenu chez plusieurs de leurs patients des concentrations en cfDNA équivalentes à celles chez leurs contrôles sains[19] et d'autres études tendent à remettre en cause cette corrélation[75]. De fait la concentration en cfDNA n'est pas une information suffisante pour servir de marqueur prédictif du cancer. En effet sa spécificité est discutée dans la mesure où des concentrations élevées en cfDNA peuvent être corrélées avec d'autres conditions médicales telles que la grossesse, des infections ou des infarctus[16]. On peut regretter que la plupart de ces études se basent sur une mesure unique ou ponctuelle (avant et après traitement) de la quantité totale de cfDNA sur une cohorte de patients[19,22]. De notre point de vue, un suivi plus régulier (hebdomadaire ou mensuel) de la charge d'ADN dans le sang doit permettre d'avoir une meilleure corrélation avec le cancer tout en limitant l'impact des autres facteurs. Enfin, la mesure de la charge en cfDNA peut être complétée par une mesure de sa fragmentation.

Jahr et al. ont proposé que la distribution en taille du cfDNA soit utilisée pour identifier le mécanisme de mort cellulaire, apoptotique ou nécrotique, à l'origine de sa libération[19]. Nous avons vu précédemment que chez des individus sains, la taille des fragments du cfDNA correspondait principalement à des multiples de 180 à 200 paires de bases[18], correspondant à la longueur de l'ADN dans un nucléosome, et caractéristique du processus apoptotique[17,19,76]. Ainsi l'apoptose semble être le mécanisme principal de libération de cfDNA dans le sang chez des individus sains[19–21,77]. Chez des patients atteints de cancer, la distribution en taille des fragments est plus variée. La taille des fragments courts varie entre 70 et 200 bp tandis que l'on retrouve de longs fragments d'environ 30 kbp caractéristiques d'évènements de mort cellulaires nécrotiques qui conserve l'intégrité de l'ADN[71,76,77]. Cette tendance s'explique par des mécanismes de nécrose, d'autophagie ou des catastrophes mitotiques plus fréquents chez les cellules tumorales[11,16]. Par conséquent, une fragmentation plus importante du cfDNA ou la présence de fragments de haut poids moléculaire peuvent servir de marqueur du cancer[76,78–80]. Par ailleurs, un index d'intégrité de l'ADN (DII) a été développé.

1.2.1.2. DNA Integrity Index

L'index d'intégrité de l'ADN (DII) représente le ratio entre les fragments longs et courts de l'ADN. En théorie, le DII d'un échantillon peut être obtenu directement après séparation des fragments par électrophorèse par exemple. Dans la pratique, et parce que le cfDNA est faiblement concentré, le DII est obtenu indirectement après amplification PCR d'un fragment court et d'un

fragment long choisis arbitrairement. Les biais de cette méthode seront discutés dans la suite de ce manuscrit.

Le DII peut servir d'indicateur de la qualité de l'ADN. Le DII sera faible dans le cas d'un ADN dégradé et très fragmenté. Par exemple la conservation FFPE des tissus, peut provoquer des cassures de l'ADN et des ponts nucléoprotéiques, autant d'évènements problématiques pour l'amplification[81].

Il peut également être utilisé comme biomarqueur du cancer dans la mesure où les fragments longs et courts de l'ADN peuvent être caractéristiques d'une origine nécrotique ou apoptotique, respectivement. La revue de Zonta et al.[16] peut être consultée pour un aperçu des études qui ont évalué l'intégrité de l'ADN pour le diagnostic et le pronostic du cancer[26,76,79,79,80]. Les conclusions de ces études sont mitigées. De manière similaire à la mesure de la charge d'ADN circulant, il peut y avoir des modulations de la taille des cfDNA au cours du temps, d'où l'intérêt d'avoir un suivi régulier des patients. Dans tous les cas, le DII apporte une première information, facile à recueillir, pouvant être par la suite confirmée par d'autres biomarqueurs.

1.2.2. Une approche ciblée : les altérations de séquence du ctDNA

Le séquençage extensif du génome de cellules tumorales a permis d'établir les altérations génétiques somatiques présentes en cas de cancer, qui sont par définition absentes chez les populations cellulaires normales. Ces mutations sont spécifiques du cancer et limitent les problèmes de faux positifs. On peut notamment citer des substitutions, insertions, délétions et translocations de bases. Outre les mutations ponctuelles, plusieurs autres altérations épigénétiques telles que des méthylations ont été détectées avec succès dans la circulation de patients[82]. En général la mutation est quantifiée et présentée comme un nombre de fragments mutants par millilitre d'échantillon, ou en tant que fraction mutante (%) dans un échantillon[17].

Certaines mutations sont connues pour être récurrentes dans une majorité de cancer, telles que les mutations des gènes KRAS, EFGR et BRAF[83]. Dès lors, il est possible de cibler directement ces mutations bien identifiées dans les échantillons sanguins. Une détection systématique peut également être envisagée pour cibler des mutations qui conditionnent l'administration ou la non-administration d'un traitement. Le suivi de certaines mutations est également intéressant pour adapter le traitement dans le temps, suite à l'apparition de nouvelles résistances, consécutives de la pression thérapeutique sélective. Par exemple Diaz et ses collaborateurs ont trouvé 42 mutations différentes du gène KRAS conférant des résistances chez des patients traités avec des inhibiteurs

EFGR, et cela cinq mois avant que les techniques d'imageries ne confirment une rechute de la maladie[84].

Toutefois, cette approche requiert d'avoir une connaissance préalable des altérations à cibler. Dans la pratique, cette information est encore une fois obtenue par biopsie et séquençage du tissu de chaque patient.

Une alternative consiste à séquencer systématiquement l'ADN génomique circulant ou du moins une grande partie à la recherche de mutations, une approche couteuse en termes de ressources, surtout à la profondeur de séquençage requise pour détecter des mutants rares. Ainsi Rosenfeld et ses collaborateurs ont séquencé l'exome (la fraction de 1 % du génome qui code pour des protéines) de six patients présentant des cancers avancés à la recherche de mutations à l'origine de résistances aux traitements[85]. Dans la même perspective, il est également possible de réduire le champ de recherche à une région du génome où il est fréquent de trouver des mutations cancéreuses. C'est l'approche choisie par Diehn et ses collaborateurs, qui ont identifié une région représentant 0,004 % du génome, où quasiment tous les patients atteints de cancers des poumons présentent des mutations[23].

L'analyse du ctDNA présente également un intérêt pour la détection de la maladie résiduelle minimale après une intervention chirurgicale où un traitement. En effet, l'analyse du ctDNA peut servir à identifier les patients qui connaitront une récidive, pour éviter de traiter sans distinction les patients présentant des risques élevés de rechute. Dans l'étude menée par Diehl et collaborateurs, un profil de mutations de chaque patient a été établi à partir de la tumeur opérée et cette signature personnelle a été utilisée pour détecter et quantifier le ctDNA pendant 2 à 5 ans après l'opération. Les patients pour lesquels du ctDNA a été détecté à la suite de l'opération ont tous connu une récidive[21].

Nous invitons le lecteur à consulter l'article de Diaz et Bardelli pour plus de détails sur l'utilisation du ctDNA pour la surveillance de la charge tumorale, la détection de la maladie résiduelle minimale, le suivi de la résistance et de l'hétérogénéité moléculaire, et la détection des altérations chromosomiques et des changements épigénétiques[17].

Nous avons vu que la quantité de ctDNA est liée à la charge tumorale et dépend considérablement du patient (entre 0,01 % et 97 % de l'ADN circulant provenant de la tumeur). A la lumière de ces données, le Tableau 1.1 apporte quelques ordres de grandeurs sur les quantités d'ADN, de génomes et de copies de variants pouvant être attendues dans la circulation d'un patient atteint de cancer.

Tableau 1.1: Ordres de grandeurs des quantités d'ADN, du nombre de génomes, de copies de gènes et de séquences ALU (courts fragments d'ADN très abondants dans le génome humain) que l'on peut attendre dans 1mL de sang d'un patient souffrant de cancer à différents stages de la maladie. Arbitrairement on a choisi une concentration en ADN moyenne de 100 ng/mL, commune chez un patient souffrant de cancer. A un stade précoce on considère que la fraction en ctDNA est comprise entre 0,1 et 1 % et entre 3 et 97% à un stade avancé. En supposant que le génome est représenté uniformément dans un échantillon et que la masse d'un génome haploïde humain est de 3,3 pg.

	ADN/mL	génomes/mL	copies/gènes/ mL	ALU/mL
Fraction totale	100 ng	30000	60000	60 milliards
Fraction tumorale (stade précoce)	0,1 - 1 ng	30 - 300	60 – 600	60 - 600 millions
Fraction tumorale (stade avancé)	3 – 97 ng	900 - 29100	1800 – 58200	1,8 – 58,2 milliards

Les mesures de la charge d'ADN circulant issu de cellules normales ou tumorales, et de son intégrité sont très dépendante des procédures de prélèvement, de stockage et d'utilisation. Par conséquent, la standardisation des méthodes pré-analytiques est indispensable pour avoir obtenir des résultats reproductibles et comparables.

1.2.3. Vers la standardisation des protocoles pré-analytiques (et analytiques)

L'absence de standardisation est notamment critique pour l'établissement de biomarqueurs pertinents, et a surement un rôle significatif dans les résultats contradictoires des études[86–88]. Par exemple, les intervalles de référence de concentrations en cfDNA sont souvent déterminés sans considérer ces sources de variabilité pré-analytique[89]. En plus de différences liées à la préparation de l'ADN, la comparaison des études est rendue difficile par les différences dans les types de données reportées. Il est impossible de comparer des résultats de PCR quantitative qui ne ciblent pas les mêmes mutations. De la même façon, le résultat dépend du type d'échantillon analysé (plasma ou sérum). Bettegowda et al. ont réalisé une vaste étude sur 640 patients présentant différents types de cancers avec des protocoles standardisés[22]. Toutefois les programmes d'étude à une telle échelle sont rares car impossible à réaliser par un unique laboratoire ou une équipe de recherche. Ainsi, les sources de variabilités sont multiples, et doivent être contrôlées pour limiter les biais et les faux positifs[90,91].

Nous avons vu précédemment que la libération de l'ADN dans la circulation dépend de paramètres comme le type et le stade du cancer, mais aussi l'âge et le sexe du patient[71,87]. Généralement les études sont réalisées sans distinction vis-à-vis de l'âge ou du sexe du patient.

Cependant, la présence d'infections ou de certaines pathologies peuvent compromettre le diagnostic du cancer. En ce qui concerne la collection des échantillons, il est préférable de collecter le sang à jeun le matin afin d'éviter un pic de concentration d'ADN circulant, si le patient s'alimente ou fait un effort physique. Le sang est généralement collecté dans des tubes EDTA – un anticoagulant préférable à l'héparine ou le citrate – pour prévenir la coagulation et dans une moindre mesure la dégradation du cfDNA par les DNases du sang[92]. Ces tubes doivent être traités en plasma ou sérum rapidement après collection (idéalement moins de 2 heures). Jung et collègues se sont intéressés à l'influence du temps entre la collection du sang et son traitement pour obtenir du plasma ou du sérum[38]. Par rapport à un traitement immédiat, ils ont observé une augmentation significative de la concentration d'ADN lorsque les échantillons de sang étaient transformés en sérum après un délai de 2H à 4°C. Il est intéressant de noter que cette tendance n'est pas retrouvée pour les échantillons transformés en plasma. Par ailleurs Madisen et al ont observé la fragmentation significative de l'ADN lorsque le sang était conservé à des températures ambiantes ou plus chaudes[93]. Dans une autre étude, Turner et collaborateurs ont comparé différents tubes de collection pour le sang[94]. Alors que le sang est normalement collecté dans des tubes EDTA avant d'être rapidement traité, ils ont utilisé des tubes Streck Cell-Free DNA et attendu entre 48 et 72 heures à température ambiante avant traitement. Pour certains des échantillons, ils ont observé une augmentation de 10 % de la concentration en cfDNA sans conséquence pour la détection de mutations. Pour éviter d'avoir une fraction du cfDNA issu de la lyse des cellules immunitaires lors de la coagulation, nous pensons qu'il est préférable de transformer le sang en plasma plutôt qu'en sérum. Dans la plupart des laboratoires le sang est centrifugé à de faibles vitesses (800-1500 g) pour obtenir du plasma. Cependant pour des applications d'ADN circulant, une étape de centrifugation supplémentaire à 16000 g ou de filtration est nécessaire pour éliminer toutes les cellules et prévenir le risque de contamination par l'ADN cellulaire[95,96]. Le plasma et le sérum sont généralement conservés à -80°C (et -20°C moins idéalement) pendant des mois voire des années. Sozzi et al. ont observé une diminution significative des concentrations en ADN (environ 30 % de pertes par an) lors de la conservation à long terme (41 mois) du plasma et de l'ADN extrait de plasma[97]. Cette information est particulièrement intéressante pour la planification d'études rétrospectives sur des banques d'échantillons, sur une longue période de temps, comme cela peut être le cas lors de larges essais cliniques. En ce qui concerne l'extraction du cfDNA, de nombreux protocoles et kits commerciaux sont disponibles et contribuent fortement à la variabilité de la qualité et de la quantité d'ADN obtenu. Certaines études avancent que la digestion du plasma par un traitement SDS/proteinase K avant extraction au phénol/chloroforme donne les meilleurs rendements d'extraction et une meilleure qualité de l'ADN[90]. Cependant cette méthode est longue et utilise des solvants organiques. Ainsi la majorité des études utilisent des kits d'extraction commerciaux tels que le QiaAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Quiagen) et le Plasma/Serum Cell-Free

Circulating DNA Purification Kit (Norgen Biotek)[91]. Pour plus de détails sur les possibles techniques d'extraction du cfDNA, il est possible de consulter la revue d'Elshimali et al[87]. Mauger et al, ont quant à eux comparé 11 méthodes d'extraction de cfDNA pour de faibles volumes de plasma (entre 200 et 1000 µL)[91] (Figure 1.4A).

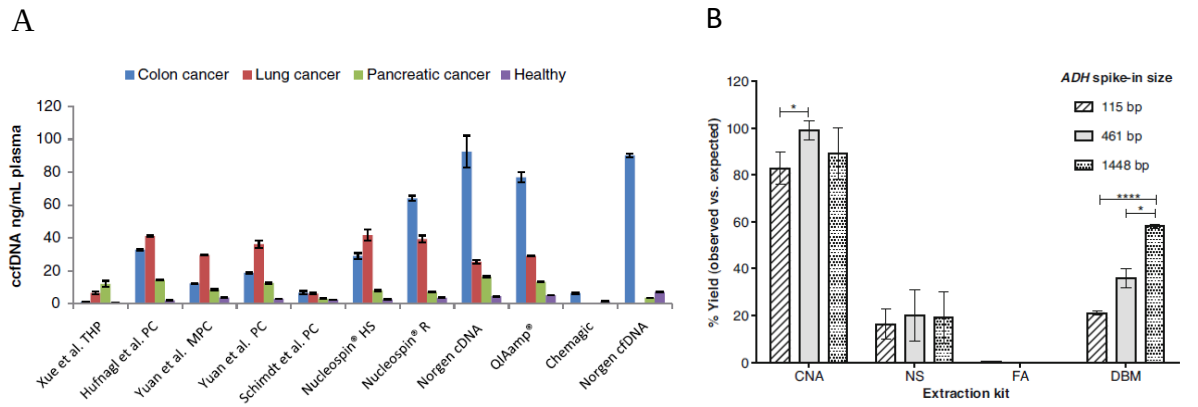


Figure 1.4. Comparaison de méthodes d'extraction du cfDNA. A) Comparaison de 11 méthodes d'extraction du cfDNA sur des échantillons de patients atteints de cancers de stade IV : colon (bleu), poumons (rouge), pancréas (vert) et contrôle sain (violet). B) Comparaison de l'efficacité d'extraction de 4 kits commerciaux (QiAamp circulating nucleic acid noté CNA, NucleoSpin Plasma XS noté NS, FitAmp plasma/serum DNA isolation noté FA et QIAamp DNA blood mini noté DBM, pour 3 différentes tailles de fragments spikés (115, 461, et 1448 bp). Tiré de Mauger et al[91] et Devonshire et al[88].

Dans leur étude, Devonshire et al, ont comparé les efficacités d'extraction de kits commerciaux grâce à un spike (introduction d'une quantité connue d'une molécule dans l'échantillon) d'ADN[88]. Ils ont trouvé que le QIAamp circulating nucleic acid kit présentait le meilleur rendement d'extraction (>80%), notamment pour les petites tailles de fragments (Figure 1.4B). Il est intéressant de relever que les rendements d'extractions des autres kits étaient très faibles (<30%). Ces différences peuvent expliquer la variabilité des résultats d'analyse du cfDNA. On peut également noter que la perte de matériel dû au rendement du kit est largement compensée par la capacité de concentration du cfDNA, notamment pour les kits permettant de traiter de larges volumes de plasma (jusqu'à 5 mL pour le QIAamp circulating nucleic acid), ou d'éluer dans de petits volumes (jusqu'à 5 µL pour le NucleoSpin). Dans cette étude, les auteurs ont également étudié différents gènes pour la quantification du cfDNA par amplification PCR. Ils ont trouvé que le nombre de copies pouvait varier d'un facteur deux en fonction du gène choisi. Ce résultat illustre comment des biais peuvent être introduits dans la partie analytique, et les problèmes liés au ciblage d'une unique région génomique pour estimer la quantité du cfDNA. Une solution pour limiter cette source de variabilité consiste à normaliser la mesure sur plusieurs gènes de référence.

Le Tableau 1.2 donne quelques pistes de recommandation pour les étapes pré-analytiques de manipulation de l'échantillon sanguin pour préserver la qualité et la quantité de l'ADN pour l'analyse.

Tableau 1.2: Pistes de recommandations pour la standardisation des étapes pré-analytiques.

Etape	Patient	Collection	Traitement	Stockage	Extraction
	Identifier l'âge, le sexe, le stade du cancer, et les éventuelles autres pathologies	Avant toute alimentation ou effort physique Tubes EDTA	Rapidement après collection (<2h) Préférablement en plasma	Plusieurs mois à -80°C	2 mL de plasma élué dans 50 µL avec le QIAamp circulating nucleic acid kit ou le Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kit

Dans cette partie nous avons vu que l'utilisation de l'ADN circulant comme biomarqueur du cancer était principalement limitée par sa faible concentration dans le sang. Nous allons à présent nous intéresser aux techniques et technologies, commerciales ou en développement permettant d'atteindre les limites de détection nécessaire à l'analyse de ce biomarqueur.

1.3. Technologies pour l'analyse de l'ADN circulant

Nous avons vu que les concentrations en cfDNA pouvaient varier de non détecté à ~1000 ng/mL chez les patients atteints de cancer, cet ADN étant plus ou moins fragmenté. Les techniques spectroscopiques et fluorimétriques permettent d'estimer directement la concentration totale en ADN de l'échantillon. Les techniques électrophorétiques permettent de séparer les fragments d'ADN pour mesurer leurs tailles. Dans ce dernier cas, la sensibilité de la détection est d'autant plus critique que la concentration en ADN est répartie entre les fragments.

Un point intéressant à discuter est que l'ADN circulant a été observé dès les années 1950, alors que les techniques de détections étaient bien moins sensibles qu'aujourd'hui[12]. C'est le marquage radioactif de l'ADN directement dans le sang ou le plasma qui a rendu possible ces premières observations[13].

1.3.1. Mesurer la concentration du cfDNA : les techniques spectroscopiques et fluorimétriques

La spectrophotométrie est une méthode qui permet de mesurer la concentration et la pureté en acides nucléiques en solution[98] (Figure 1.5). Elle se fonde sur l'absorbance des oligonucléotides par les UVs afin de mesurer une densité optique (DO) à la longueur d'onde de 260 nm. Les contaminations par les protéines et les phénols sont évaluées par mesure de DO à 280 nm. Cette mesure est utile pour vérifier que l'ADN extrait d'un échantillon sanguin est libre de toutes interactions protéiques. La mesure de la densité optique à 230 nm permet quant à elle de vérifier l'absence de contamination par des solvants ou des sels souvent utilisés lors des étapes d'extraction. La pureté de l'ADN est acceptable lorsqu'on a un ratio $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$ et $OD_{260}/OD_{230} \geq 1,6$. La spectrophotométrie est une technique qui a l'avantage d'être directe et ne nécessite pas d'étalon. Cependant son utilisation est limitée à des échantillons relativement propres pour la mesure précise de la concentration en ADN. De plus, elle ne permet pas de distinction entre les différents types d'acides nucléiques comme l'ARN ou l'ADN simple brin, ce qui peut conduire à une surestimation de la concentration en ADN. Ainsi les échantillons sanguins ne peuvent pas être analysés par spectrophotométrie sans étapes de purification. Le spectrophotomètre de référence dans les laboratoires est le NanoDrop (Thermo Scientific). Il permet notamment de préserver l'échantillon car une goutte de quelques microlitres (0,5 – 2 µL) suffit pour la mesure. Toutefois, pour l'ADN double

brin, la limite de sensibilité est de 2 ng/µL, soit 2000 ng/mL, ce qui rend son usage inadapté pour la détection du cfDNA sans étapes de concentration préalable.

Une autre technique directe de détection consiste à utiliser des rapporteurs fluorescents dans la séquence ou à l'extrémité de la molécule d'ADN[99] (Figure 1.5). Ces marqueurs sont plus ou moins spécifiques des différentes espèces d'acides nucléiques. Le marquage avec des isotopes radioactifs comme le P^{32} a été très utilisé pour les techniques de Southern Blotting (une technique utilisée pour rechercher des fragments d'ADN en les hybridant à une sonde complémentaire après électrophorèse) car il permet une détection très sensible (jusqu'à la molécule unique). Toutefois son usage se raréfie au profit de méthodes moins exigeantes en environnement et confinement. Ainsi de nombreux agents fluorescents ont été développés pour s'intercaler le long de la molécule d'ADN, au niveau des sillons majeurs ou mineurs[100], ou en bout de chaîne, le plus souvent par incorporation enzymatique de nucléotides marqués[101]. Les agents intercalants sont généralement spécifiques de l'ADN et leur fluorescence augmente significativement lors de l'interaction afin de détecter un signal tout en limitant le bruit de fond. La mesure de l'intensité de fluorescence est corrélée avec la concentration en ADN[102]. Des intercalants tels que le SYBR Green (Applied Biosystems), le SYTOX Orange (Thermo Fisher) ou le YOYO-1 sont communément utilisés en solution et certains, comme le Hoechst, permettent même de marquer l'ADN à l'intérieur du noyau de la cellule. La concentration de l'intercalant est importante pour le marquage de l'ADN résiduel. En effet, dans la mesure où la quantité de molécules d'ADN à marquer est faible, il est possible d'ajuster à la baisse la concentration en intercalant de manière à minimiser le bruit de fond pour un gain de sensibilité significatif. Cependant, le marquage étant dynamique, il est favorisé lorsque les constantes d'associations – qui dépendent de la concentration des espèces – sont supérieures aux constantes de dissociations[103].

Le Qubit (Life Technologies) est un fluorimètre très présent dans les laboratoires et différents kits permettent de quantifier l'ADN, l'ARN ou les protéines. Un kit en version haute-sensibilité est censé permettre la mesure de concentrations totale d'ADN aussi basses que 10 ng/mL ce qui le rend potentiellement adapté à la détection de cfDNA purifié[104]. Il est intéressant de noter qu'à notre connaissance, il n'existe pas d'études rapportant le marquage direct du cfDNA dans le sang et ses dérivés. Cela peut s'expliquer par la difficulté de détecter les faibles concentrations en cfDNA par fluorescence et par la présence dans les fluides biologiques d'espèces chargées et potentiels compétiteurs d'interaction comme les protéines. Breithbatch et al. ont toutefois montré qu'il était possible de détecter directement sans purification du plasma une séquence spécifique après amplification par PCR quantitative (qPCR)[105].

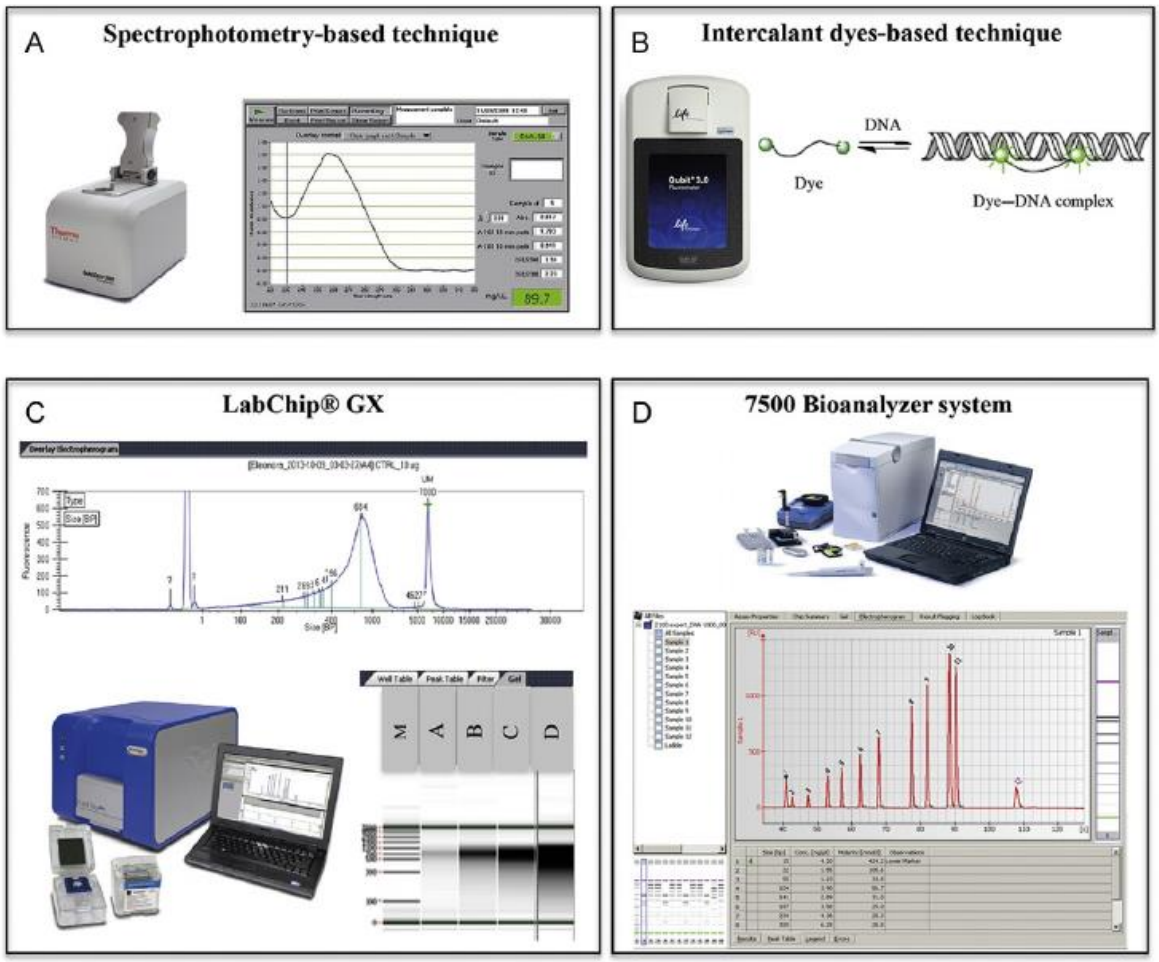


Figure 1.5. Exemples de méthodes permettant de quantifier et d'évaluer la pureté de l'ADN. A) Les techniques de spectrophotométrie : la concentration en ADN est déterminée grâce à la valeur de son absorbance à 260 nm. Les ratios OD_{260}/OD_{280} et OD_{260}/OD_{230} permettent de vérifier les contaminations en protéines ou en sels, respectivement. Le NanoDrop est l'instrument de référence. *Copyright Thermo Fisher Scientific Inc.* B) Les techniques fluorimétriques : la concentration en ADN est déterminée grâce à une mesure de l'intensité de fluorescence d'un fluorophore en interaction avec l'ADN. Des kits permettent aussi de mesure les concentrations en protéines et en ARN ce qui peut être utilisé pour évaluer les contaminations par ces espèces. L'instrument de référence est le Qubit. *Copyright Life Technologies.* C) et D) Techniques électrophorétiques. Elles permettent de déterminer la taille et la concentration des différents fragments d'ADN de l'échantillon. C) LabChip GX Touch. *Copyright Perkin Elmer.* D) Bioanalyzer System. *Copyright Agilent Technologies.* Tiré de Zonta et al.[16].

1.3.2. Mesurer la taille du cfDNA : les techniques électrophorétiques de séparation

Si les techniques de spectrophotométrie et de fluorimétrie renseignent sur la concentration et la qualité de l'ADN de l'échantillon, elles n'apportent aucune information sur son intégrité. La séparation des fragments d'ADN, indispensable pour l'analyse de la distribution en taille, peut être réalisée par électrophorèse (Figure 1.5). Dans la mesure où l'ADN est une molécule chargée négativement il est possible de forcer le transport en la soumettant à un champ électrique. En solution, la mobilité électrophorétique de l'ADN dépend peu de la taille de la molécule[106].

L'utilisation de matrices solides de types gels ou polymères depuis le milieu du 20ème siècle a permis de lever cette limitation en créant un réseau à travers lequel les petites molécules se faufilent plus facilement que les grandes. Ainsi, la vitesse de migration dépend de la masse moléculaire plutôt que de la charge de la molécule. Depuis cette époque, l'électrophorèse sur gel est toujours utilisée en routine dans les laboratoires car elle permet une séparation efficace à faible coût en quelques dizaines de minutes. En général, la migration est réalisée simultanément pour l'échantillon d'ADN et une échelle de taille qui sert de référence. Une étape de révélation, le plus souvent à l'aide d'un intercalant fluorescent de type bromure d'éthidium (BET), permet la visualisation de bandes correspondant aux différentes tailles de fragments. La résolution des bandes dépend de la matrice et du tampon utilisé mais elle peut atteindre quelques dizaines de paires de bases[107]. Le gel d'électrophorèse peut être utilisé pour rapidement discriminer de longs fragments d'ADN génomique intacts issus de la nécrose, bloqués au niveau du puits, et ceux plus courts, issus de l'apoptose qui vont former une trainée dans le gel. Par ailleurs, la comparaison de l'intensité de l'échantillon avec celle de la référence permet une estimation semi-quantitative de la concentration des fragments. Toutefois, il faut noter que la sensibilité de cette technique est très limitée pour l'analyse du cfDNA purifié. En effet la détection d'une bande nécessite environ 10 ng de matériel. Dans la mesure où la contenance des puits du gel est généralement une dizaine de µL, la concentration d'une taille de fragment doit être à ~1 µg/mL pour être détectée, bien au-dessus de la concentration totale du cfDNA dans le sang.

1.3.2.1. L'électrophorèse capillaire

Le développement de l'électrophorèse capillaire dans les années 1990 a permis d'améliorer les performances de séparation en réduisant la dispersion et donc en améliorant la sensibilité[108] (Figure 1.5). Le principe de séparation est le même que sur gel. Aujourd'hui, les capillaires inspirés des technologies de fibres optiques mesurent quelques dizaines de micromètres de diamètres et les fragments migrent sur une distance de quelques dizaines de centimètres jusqu'à passer devant un détecteur UV ou de fluorescence. La taille des fragments est évaluée en fonction de leur temps de passage devant le détecteur (Figure 1.6). L'automatisation avec des nappes de capillaires permet de traiter plus d'échantillons, ce qui accélère les séparations à une trentaine de minutes pour une centaine de résultats simultanés.

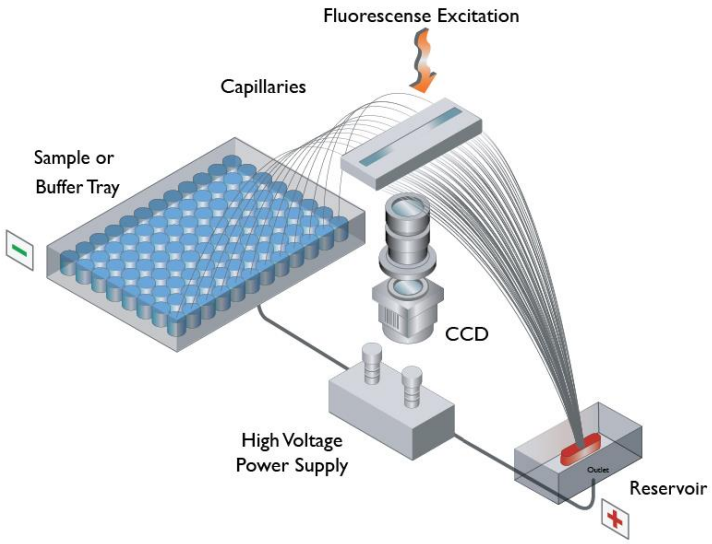


Figure 1.6: Présentation du Fragment analyzer, un exemple d'électrophorèse capillaire commercial. En moins de 25 minutes, jusqu'à 96 échantillons placés dans les puits d'une plaque peuvent être injectés et séparés dans des multi-capillaires grâce à l'application d'un champ électrique. L'ADN est marqué en fluorescence et le signal est recueilli par une caméra CCD après excitation. *Copyright Advanced Analytical.*

1.3.2.2. Amélioration de la sensibilité de détection

A ce stade de notre étude, il est possible de s'interroger sur les stratégies pour augmenter la sensibilité des systèmes électrophorétiques. Trois axes de développement doivent être explorés pour atteindre de bonnes sensibilités. Nous avons déjà vu que le choix de l'intercalant[100,102,103] et sa concentration étaient des paramètres importants pour optimiser la sensibilité de détection. Du côté de l'instrumentation, il est préférable de privilégier les sources laser du fait de leur finesse spectrale. Néanmoins, les sources LED sont plus souvent utilisées, car elles sont moins chères au prix d'une largeur spectrale plus grande et donc moins de performance en terme de bruit de fond de mesure. De plus, il est nécessaire d'optimiser le couplage entre le module fluidique et le module optique afin de collecter un maximum de photons (l'ouverture numérique du système de détection doit être optimale). Enfin, il est possible de préconcentrer l'échantillon en entrée de capillaire ou de canal microfluidique[109]. La méthode de stacking (empilement) d'échantillon par amplification de champ sera décrite en détail dans la suite de ce manuscrit. Le stacking de l'ADN dans un volume dix fois plus petit que celui de l'échantillon injecté (ou plug) permet de gagner un facteur 10 sur la limite de détection. Ainsi on retrouve cette étape dans de nombreux dispositifs d'électrophorèses commerciaux. Toutefois, l'analyse de l'ADN est limitée à des échantillons purifiés et élués dans de l'eau ou dans un tampon Tris-EDTA (TE), car la faible teneur en sel de l'analyte est primordiale pour réaliser l'étape de stacking.

Les dispositifs les plus sensibles détectent aujourd'hui des concentrations inférieures au ng/µL[16,110,111]. Ils sont par conséquent plus adaptés à l'analyse de la concentration et de l'intégrité du cfDNA que les gels de paillasse. L'instrument d'électrophorèse capillaire le plus sensible du marché est le Fragment Analyzer développé par Advanced Analytical (Figure 1.5 et Figure 1.6). Dans sa version de kit ultra-sensible, il spécifie être capable de détecter un fragment à 5 ng/mL ou une injection d'ADN génomique à 50 ng/mL. Cette sensibilité peut être discutée car la limite de détection est établie pour un échantillon dilué par un facteur 10 dans le tampon de séparation (typiquement 2 µL d'échantillon dans 20 µL de tampon). Ainsi une technologie moins sensible mais diluant moins l'échantillon pourrait arriver au même résultat. Dans son mode d'utilisation le plus rapide, 96 échantillons peuvent être séparés simultanément en 25 minutes (compter plutôt 50 minutes pour une meilleure résolution et sensibilité de mesure). Les erreurs avancées sur la mesure de taille et de concentration sont de plus ou moins 5% et 25%, respectivement.

La Figure 1.7 présente une étude menée par Advanced Analytical pour comparer l'analyse du cfDNA par le Fragment Analyzer (Advanced Analytical) (Figure 1.7A) et le Bioanalyzer (Agilent), un système d'électrophorèse microfluidique qui sera présenté dans la partie suivante (Figure 1.7B). Pour un échantillon de cfDNA, extrait à partir de sérum humain et concentré à 1,25 µg/mL le profil est bien établi. A la vue de ces résultats, et en connaissance de la limite de sensibilité de 5 ng/mL, spécifiée par le Fragment Analyzer, il semble pertinent de s'interroger sur la faible utilisation de cette technologie pour l'analyse en routine du cfDNA et l'établissement de DII en routine.

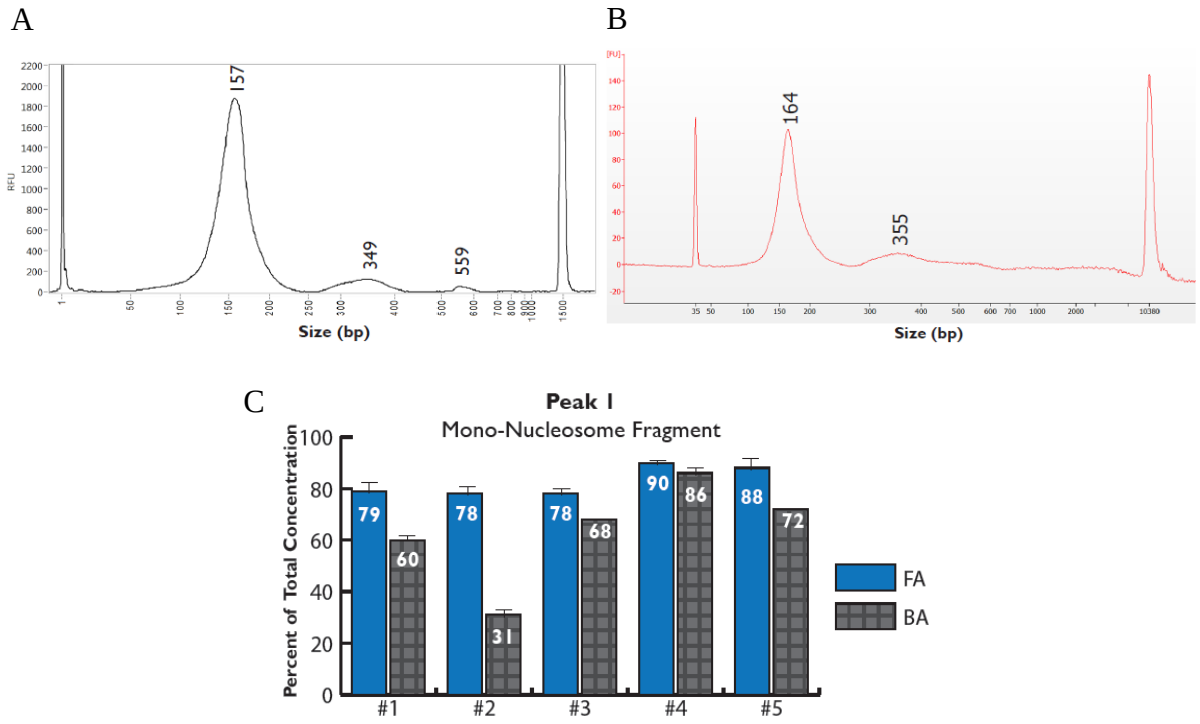


Figure 1.7. Comparaison entre le Fragment Analyzer et le Bioanalyzer 2100 pour l'analyse du cfDNA. Environ 1,25 µg/mL de cfDNA a été extrait à partir d'échantillons de sérum humain avec le kit d'extraction QIAmp circulating Nucleic Acid Kit. A) Séparation du cfDNA avec le HS Small Fragment Kit du Fragment Analyzer. 3 pics correspondent aux tailles du mono-nucléosome, di-nucléosome et tri-nucléosome. B) Séparation du cfDNA avec le HS DNA Kit du Bioanalyzer. Seulement deux pics sont visibles et correspondent aux tailles du mono-nucléosome et du di-nucléosome. C) Evaluation de la fraction de cfDNA dans le premier pic sur 5 échantillons de patients sains avec le Fragment Analyzer (FA) et le Bioanalyzer (BA). *Tiré d'une étude comparative menée par Advanced Analytical.*

Dans une étude comparative récemment soumise à publication, Picometrics Technologies, une start-up toulousaine qui exploite industriellement la technologie de séparation d'ADN développée par le LAAS, a utilisé le Fragment Analyzer pour caractériser plusieurs échantillons de cfDNA représentatifs de patients malades pour les fortes concentrations de cfDNA ou sains pour les plus faibles (Figure 1.8). A une concentration totale en cfDNA de 500 ng/mL, un unique fragment autour de 160 bp est visible (panneau de gauche dans la Figure 1.8). Pour une dilution du cfDNA à 49 ng/mL, la détection s'est révélée impossible (Figure 1.8C).

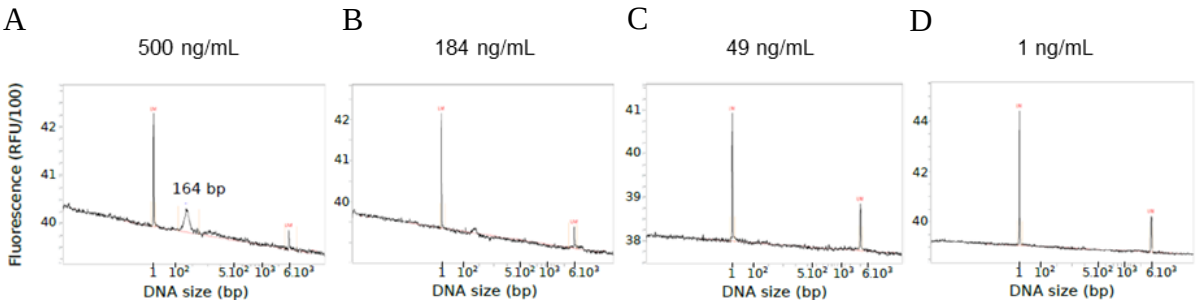


Figure 1.8. Analyse de dilutions d'un échantillon de cfDNA d'un patient souffrant d'un mélanome par le kit haute sensibilité (DNF-474) du Fragment Analyzer. A) [cfDNA]= 500 ng/mL. B) [cfDNA]= 184 ng/mL. C) [cfDNA]= 49 ng/mL. D) [cfDNA]= 1 ng/mL.

Il nous semble opportun de mentionner à ce moment le développement d'un système commercial d'électrophorèse capillaire, nommée BIABooster, issu du transfert industriel de la technologie utilisée pendant nos travaux de thèse. Avec ce système, la pré-concentration de l'échantillon ne nécessite pas de solution à faible force ionique pour une limite de détection de 20 pg/mL. Le BIABooster a permis de caractériser tous les profils de cfDNA présentés en Figure 1.8.

Le BIABooster, les techniques de stacking et autres alternatives de concentration sont abordés plus en détails dans la suite de ce manuscrit.

1.3.2.3. Les technologies microfluidiques d'électrophorèses

Dans les années 2000, le développement des technologies microfluidiques[112] a permis l'apparition de nouveaux systèmes électrophorétiques performants en termes de sensibilité, consommant peu d'échantillon et capables de délivrer un résultat en quelques minutes[113–116]. Brièvement, la dissipation de chaleur est bien meilleure pour les dispositifs microfluidiques par rapport aux capillaires, ce qui permet l'application de champs électriques plus importants, et comme les distances de séparation sont plus courtes, le temps de séparation peut être réduit (Figure 1.9). Aussi, la plupart des systèmes électrophorétiques commerciaux affichant des limites de détection autour de 100 ng/mL ont remplacé le capillaire par le format puce (Figure 1.9). Parmi les plus communément répandus, on peut notamment citer le Experion (BIORAD), le Bioanalyzer et le Tapestation (Agilent), le QIAxcel (Qiagen), le LabChip GX Touch (Perkin Elmer).

A B C

Figure 1.9. Exemples de cassettes microfluidiques commerciales. A) et B) Cassettes microfluidiques utilisées par le Bioanalyzer. C) Cassettes microfluidiques utilisées par le TapeStation. ***Copyright Agilent Technologies.***

Les performances et spécifications des différents instruments d'électrophorèses sur puce ou capillaires sont résumées dans le Tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Exemples de systèmes d'électrophorèse commerciaux pertinents pour l'analyse du cfDNA. Les kits sont sélectionnés en particulier pour leur sensibilité. Attention il faut prendre en compte une éventuelle dilution de l'échantillon dans le tampon de séparation pour connaitre la concentration réelle de l'échantillon pouvant être détectée. Les gammes de taille sont appropriées pour mesurer des longueurs multiples de nucléosomes ou de longs fragments d'ADN génomique. Le temps d'analyse donné est celui pour effectuer un run mais plusieurs dizaines d'échantillons peuvent être passés dans un même run.

Instrument (Company)	Format	Produit (ou référence)	Volume d'injection minimal (µL)	Gamme de taille (bp)	Résolution maximale (bp)	Limite de détection par fragments (ng/mL)	Temps d'analyse (min)
Fragment Analyzer (Advanced Analytical)	Capillaire	High Sensitivity Small Fragment Analysis Kit	24 (2 µL d'échantillon requis pour dilution)	50-1500	3	5	25 à 80
		High Sensitivity Genomic DNA Analysis Kit		50-4000	13	50	
Bioanalyzer (Agilent)	Puce	High sensitivity DNA kit	6 (1 µL d'échantillon requis pour dilution)	50-7000	5	100	45
TapeStation (Agilent)	Puce	High Sensitivity D1000 Screen Tape	2	35-1000	5	5	20
		Genomic DNA ScreenTape		200 à >60000	30	500	
Experion (BIORAD)	Puce	DNA 1K	1	15-1500	5	500	40
QIAxcel (Qiagen)	Puce	DNA High Resolution Kit	0,1	15-5000	3	100	7 à 12
LabChip GX Touch (PerkinELmer)	Puce	DNA High Sensitivity	10 (2 µL d'échantillon requis pour dilution)	50-5000	5	5	180 (pour 96 échantillons)
MCE-202 MultiNA (Shimadzu)	Puce	DNA-12000	2	100-12000	10	500	120 (pour 108 échantillons)
BluePippin (Sage Science)	Puce	BED2010	40 (30 µL d'échantillon requis pour dilution)	100-600	8	250	50

En dehors des produits commerciaux, des puces microfluidiques intégrant de nouvelles fonctions de séparation sont développées. En effet, les techniques de fabrication des puces offrent plus de versatilité que pour les capillaires et permettent le design de réseaux fluidiques sophistiqués, l'introduction de motifs dans les canaux et l'apparition de nouveaux modes de séparation. Par exemple, les gels et les matrices de polymères ont pu être remplacés par des réseaux contrôlés et très reproductibles de piliers, fabriqués par photolithographie optique[117] ou électronique[118]. Une autre innovation consiste à appliquer des champs pulsés asymétriques. Ces nouvelles méthodes électrophorétiques ont permis le développement de nouveaux concepts comme le « prisme à ADN »[119,120] (Figure 1.10). Ces dernières offrent la perspective intéressante de pouvoir fractionner et collecter des sous populations de cfDNA, par exemple, pour des applications de séquençage. Pour plus de détails, sur ces technologies d'électrophorèses microfluidiques, il est possible de se référer à la revue de Dorfman[121].

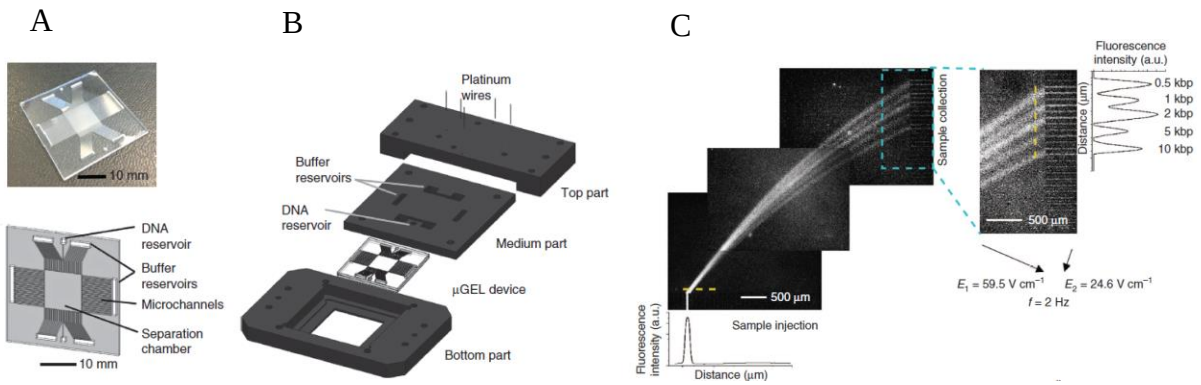


Figure 1.10. Exemple de séparation en biais de l'ADN sur puce microfluidique. A) Photographie de la puce microfluidique en verre. B) Représentation schématique de la puce microfluidique. C) Réprésentation schématique du support dans lequel s'intègre la puce microfluidique avec des emplacements pour les réservoirs et les électrodes. C) Séparation en biais de l'ADN en alternant entre deux champs électriques E_1 et E_2 dans des directions différentes. Les fragments peuvent même être collectés en fonction de leur taille en sortie. Tiré de Gumuscu et al.[120].

Le Tableau 1.4 compare les avantages et les inconvénients des différentes techniques pour la quantification et l'évaluation de l'intégrité de l'ADN.

Tableau 1.4: Comparaison des techniques pour la quantification et l'évaluation de l'intégrité de l'ADN.

<table>
<tr><th></th><th>Spectrophotométrie UV</th><th>Fluorimétrie</th><th>Electrophorèses en gel d'agaroses</th><th>Electrophorèses capillaires et microfluidiques</th></tr>
<tr><td rowspan="4">Avantages</td><td>Quantification directe (sans dilution, marquage, étalons)</td><td>Haute sensibilité (5 ng/mL)</td><td rowspan="2">Information sur l'intégrité de l'ADN</td><td>Haute sensibilité (jusqu'à 5 ng/mL)</td></tr>
<tr><td>Faible consommation d'échantillon (0,5 – 2 µL)</td><td>Faible consommation d'échantillons (1 µL)</td><td>Information sur l'intégrité de l'ADN</td></tr>
<tr><td>Rapidité (quelques secondes)</td><td>Quantification spécifique de l'ADN double brin</td><td rowspan="2">Faible coût</td><td>Automatisation et parallélisation (>100 échantillons/heures)</td></tr>
<tr><td>Information sur les contaminations (protéines, sels, solvants)</td><td>Information sur les contaminations (protéines/ADN)</td><td>Faibles consommation d'échantillons (1-2 µL)</td></tr>
<tr><td rowspan="5">Inconvénients</td><td>Sensibilité limitée (2 µg/mL)</td><td>Dilution dans une solution de marquage</td><td>Sensibilité limitée (1 µg/mL)</td><td rowspan="5">Coûts (instrument et consommable)
Nécessite une référence interne</td></tr>
<tr><td>Pas d'information sur l'intégrité de l'ADN</td><td>Pas d'information sur l'intégrité de l'ADN</td><td>Estimation semi quantitative de la concentration en ADN</td></tr>
<tr><td>Pas de discrimination entre ADN double brin, ADN simple brin et ARN</td><td rowspan="3">Nécessite un étalon</td><td>Pas d'information sur les contaminations</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Nécessite un blanc de mesure</td><td>Assez long (40 minutes de séparation + fabrication du gel)</td></tr>
<tr><td>Nécessite une référence</td></tr>
</table>

1.3.3. L'amplification par PCR pour la détection de l'ADN résiduel

Nous avons vu que la sensibilité des technologies de détection est souvent limitée pour l'analyse du cfDNA. L'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) est la technique de référence pour obtenir suffisamment de matériel pour l'analyse. Elle permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN connue.

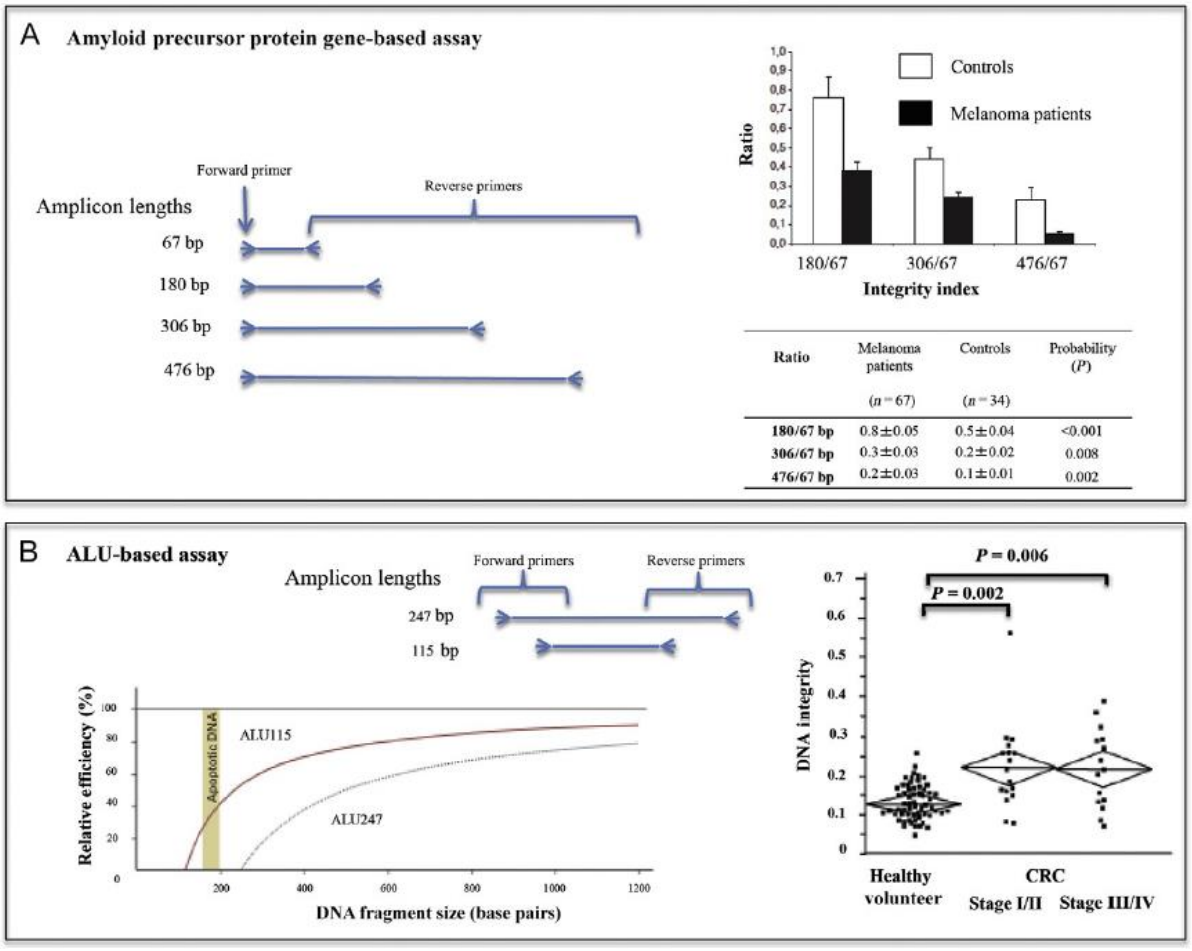
1.3.3.1. Quelques éléments sur l'amplification par qPCR et son application au cfDNA

La PCR quantitative (qPCR) utilise un rapporteur fluorescent, comme l'intercalant d'ADN SYBR Green ou une sonde nucléotidique de type Taqman, pour déterminer la concentration en ADN amplifié, dit « amplicon ». En qPCR, l'ADN est amplifié jusqu'à ce qu'il produise un niveau de fluorescence seuil associé à un nombre de cycles. La corrélation de la concentration avec le nombre de cycle est établie avec un ADN de référence de concentration connue. Ainsi lorsque ce seuil est atteint, il est possible d'en déduire la concentration initiale du fragment cible[122]. Cette technique peut donc être utilisée de déterminer la concentration de fragments d'ADN présents en quantités limités dans l'échantillon.

Pour la détermination du DII (index d'intégrité de l'ADN, cf §2.1), il est possible d'amplifier sélectivement des fragments de tailles différentes en plusieurs réactions, ou dans un même tube par multiplex qPCR[123]. En pratique, la taille des fragments amplifiables est limitée à quelques milliers de bases. Au-delà, l'amplification perd en efficacité et en fidélité. Deux couples d'amorces ou une amorce « sens » commune et deux amorces « anti-sens » différentes sont généralement utilisées pour cibler une même séquence[79] (Figure 1.11). Dans le cas de l'ADN circulant, un couple d'amorces peut par exemple amplifier seulement les fragments de tailles >200 bp portant la séquence ciblée (d'origine nécrotique) quand l'autre couple (à l'intérieur de la région de liaison du premier couple) amplifiera toutes les tailles de fragments (les fragments courts entre 50 et 200 bp, d'origine apoptotique, et les fragments >200 bp). Cette méthode est valable si l'on a vérifié (par exemple sur un amplicon, c'est-à-dire un fragment d'ADN obtenu par amplification, référence de concentration connue) que le rendement d'amplification ne dépend pas de la taille de l'amplicon. Par exemple, Moulière et al. ont observé que l'amplification était plus efficace pour des amplicons <100 bp[76].

Pour le DII, le choix de la séquence cible à amplifier est totalement arbitraire. Les séquences répétées et non codantes, telles que ALU et LINE1 sont souvent privilégiées car elles sont très

abondantes dans le génome humain (environ 1 200 000 et 500 000 copies par génome, respectivement)[124,125] (Figure 1.11). Les amplicons ALU115 et ALU247, composés de 115 et 247 paires de bases, respectivement, sont parmi les plus utilisées pour tester l'intégrité de l'ADN[26]. Les amplicons ALU115, plus courts, sont censés être représentatifs de la quantité totale de l'ADN circulant tandis que les amplicons ALU247, représentent l'ADN issu de cellules non apoptotiques. Toutefois, pour établir un DII très différent entre les patients atteints de cancer et les contrôles sains, la démarche de la majorité des études est empirique (Figure 1.11). Elle consiste à tester différentes séquences et des gènes d'intérêts. Il est également possible de tester plusieurs couples d'amorces qui permettront d'amplifier différentes tailles de population de fragments. De plus, la précision de la mesure de concentration et de fragmentation par qPCR est typiquement de 20-50% ou plus[126].



Ratio	Melanoma patients (n = 67)	Controls (n = 34)	Probability (P)
180/67 bp	0.8±0.05	0.5±0.04	<0.001
306/67 bp	0.3±0.03	0.2±0.02	0.008
476/67 bp	0.2±0.03	0.1±0.01	0.002

Figure 1.11. Détermination de l'index d'intégrité de l'ADN par qPCR A) Test d'intégrité du gène qui code pour le précurseur de l'amyloïde[127]. Quatre amplicons de 67, 180, 306 and 476 bp sont utilisés pour établir 3 index d'intégrité qui diffèrent entre les patients atteints de mélanomes et les contrôles. B) Test d'intégrité de la séquence ALU[26]. Deux amplicons de 249 et 115 bp sont utilisés. L'efficacité relative d'amplification en fonction de la taille de l'amplicon est schématisée. L'ADN est en moyenne plus fragmenté dans le sérum des contrôles que chez les patients atteints de cancer du sein. Tiré de Pinzani et al. et Umetani et al. et adapté de Zonta et al.[16].

Cette méthode se prête à quelques réflexions. Il faut d'abord rappeler que ces études reposent sur l'hypothèse *a priori* justifiée mais difficile à démontrer que la mesure de fragmentation sur une séquence choisie est représentative de la fragmentation de l'ensemble de l'ADN de l'échantillon. Plus critique, la calibration de la qPCR doit être faite avec des étalons de qualité comparable à l'échantillon. Une autre limitation peu évoquée dans la littérature, et liée à la qualité de l'ADN, est le fait que la PCR fonctionne sur des échantillons dénaturés. Par conséquent les cassures simples brins peuvent induire une surestimation de la fragmentation dans une proportion difficile à mesurer. Un autre facteur, plutôt rare mais difficile à prendre en compte, est le fait que si la séquence ciblée est tronquée par la fragmentation, les deux amorces ne pourront pas s'hybrider et l'amplification sera perturbée.

En ce qui concerne l'analyse des altérations génétiques dans le sang, la qPCR peut difficilement être utilisée en routine pour identifier des variants d'ADN tumoral dans la circulation des patients atteints de cancer[17]. En effet, nous avons vu qu'à un stade d'avancement précoce du cancer, le ctDNA ne représente souvent qu'une faible fraction (<1 %) du cfDNA total[20–24]. De plus, une mutation est bien plus rare qu'une séquence répétée de type ALU. Si l'on se réfère au Tableau 1.1, pour un individu à un stade précoce, avec une concentration en cfDNA de 100 ng/µL et une fraction en ctDNA de 1 %, on a alors moins d'une copie de la séquence cible mutée par microlitre de sang. Généralement la qPCR est incapable d'identifier des allèles mutés à une fréquences <1 % car elle amplifie aussi les allèles communs de séquences similaires, provoquant un grand bruit de fond pour la détection[128]. Ainsi la sélectivité et donc la sensibilité de la qPCR parait plus adaptée pour l'analyse des altérations génétiques plus nombreuses dans le tissu tumoral que dans le sang, à l'exception des cas de tumeurs très avancées[20,21]. Diaz et Bardelli ont d'ailleurs référencé les différentes méthodologies basées sur des principes d'amplification ainsi que leur sensibilité pour la détection de l'ADN tumoral circulant (Figure 1.12)[17].

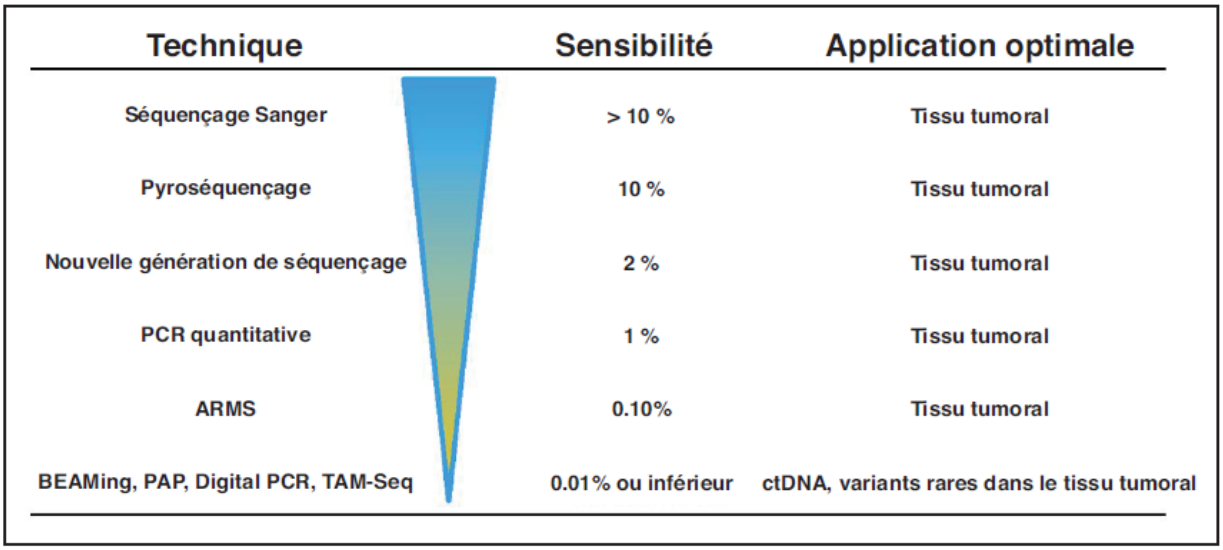


Figure 1.12. Techniques d'amplification potentielle pour la détection de l'ADN tumoral circulant. Leur application optimale est donnée en fonction de leurs sensibilités. Tiré de Diaz et Bardelli[17].

Toutefois, pour la mesure de l'intégrité de l'ADN circulant et la détection de mutations, le développement des technologies de PCR digitale a permis d'améliorer les performances de sensibilité.

1.3.3.2. La PCR digitale

Le fonctionnement de la PCR digitale (dPCR) repose sur l'amplification d'une unique molécule d'ADN préalablement compartimentée dans une chambre de réaction miniature constituée par une goutte[128–131]. Pour ce faire, l'échantillon ADN est dilué de façon à ce que chaque compartiment contienne une ou zéro molécule cible. *In fine*, l'ADN est distribué dans des centaines voire des millions de compartiments de volumes de l'ordre du picolitre ou du nanolitre, chacun contenant le matériel nécessaire pour l'amplification (enzymes, amorces, nucléotides, marqueurs fluorescents…). Après les cycles en température, le nombre de compartiments ayant réagi positivement ou négativement permet de déterminer le nombre de copies d'ADN cible initialement présents dans l'échantillon. Par rapport à la qPCR, la dPCR est plus couteuse et sa gamme de travail plus restreinte, mais elle a l'avantage de pouvoir identifier un allèle muté parmi un millier d'allèles sauvages (Figure 1.12). En effet la sensibilité de la dPCR est seulement limitée par le nombre de molécules pouvant être analysées et le taux de faux positifs causés par l'amplification ou la détection[132].

Les avancées dans les domaines de la microfabrication et de la microfluidique ont contribué au développement des systèmes de dPCR, en permettant de miniaturiser les compartiments et de manipuler des petits volumes de fluides ou de gouttes. Plusieurs technologies de dPCR sont disponibles commercialement. Les instruments BioMark HD (Fluidigm Corporation) et OpenArray RealTime PCR System (Life Technologies) utilisent des chambres de réactions sur puces ou plaques tandis que les instruments QX100 dPCR System (Bio-Rad Laboratories), RainDrop Digital PCR (RainDance) et Naica System (Stilla Technologies) utilisent des gouttes. Pour une revue des spécifications de ces différents instruments, il est possible de se référer à l'article de Monya Baker[128]. D'un point de vue pratique, un des challenges de ces technologies réside dans leur capacité à générer, manipuler et analyser plusieurs dizaines de milliers voire plusieurs dizaines de millions de compartiments dans des délais raisonnables. Les logiciels de traitement d'images et de données et l'automatisation ont notamment permis de réduire les temps d'analyses à quelques heures auquel il faut rajouter les étapes pré-analytiques d'extraction et d'amplification du matériel.

A travers l'exemple de la Figure 1.13, nous présentons des ordres de grandeurs pour la détection de cibles tumorales dans la circulation par dPCR. Pour ce faire, nous prenons l'exemple d'un patient avec 100 ng/mL de cfDNA et 1% de cet ADN issu de cellules tumorale. Pour de telles concentrations, la dPCR semble bien adaptée pour la détection d'un faible nombre de copies d'ADN tumoral.

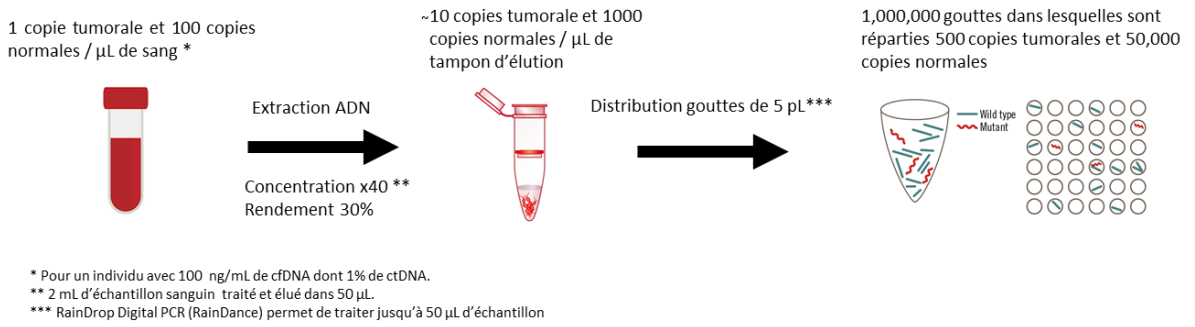


Figure 1.13. Ordres de grandeurs pour la détection de fragments d'ADN tumoral dans la circulation d'un patient avec la technologie RainDrop Digital PCR (RainDance). L'individu considéré à une charge d'ADN circulant de 100ng/mL dont 1% de ctDNA comme présenté dans le tableau 1.1.

Pour la détection de mutations rares, Pekin et al. ont présenté un dispositif non commercial en utilisant un système de dPCR en gouttes (Figure 1.14)[133]. La dPCR permet également de cibler plusieurs séquences. Didelot et al. ont présenté une méthode de dPCR en gouttes multiplexée pour l'évaluation de l'intégrité de l'ADN dans des tissus FFPE[126].

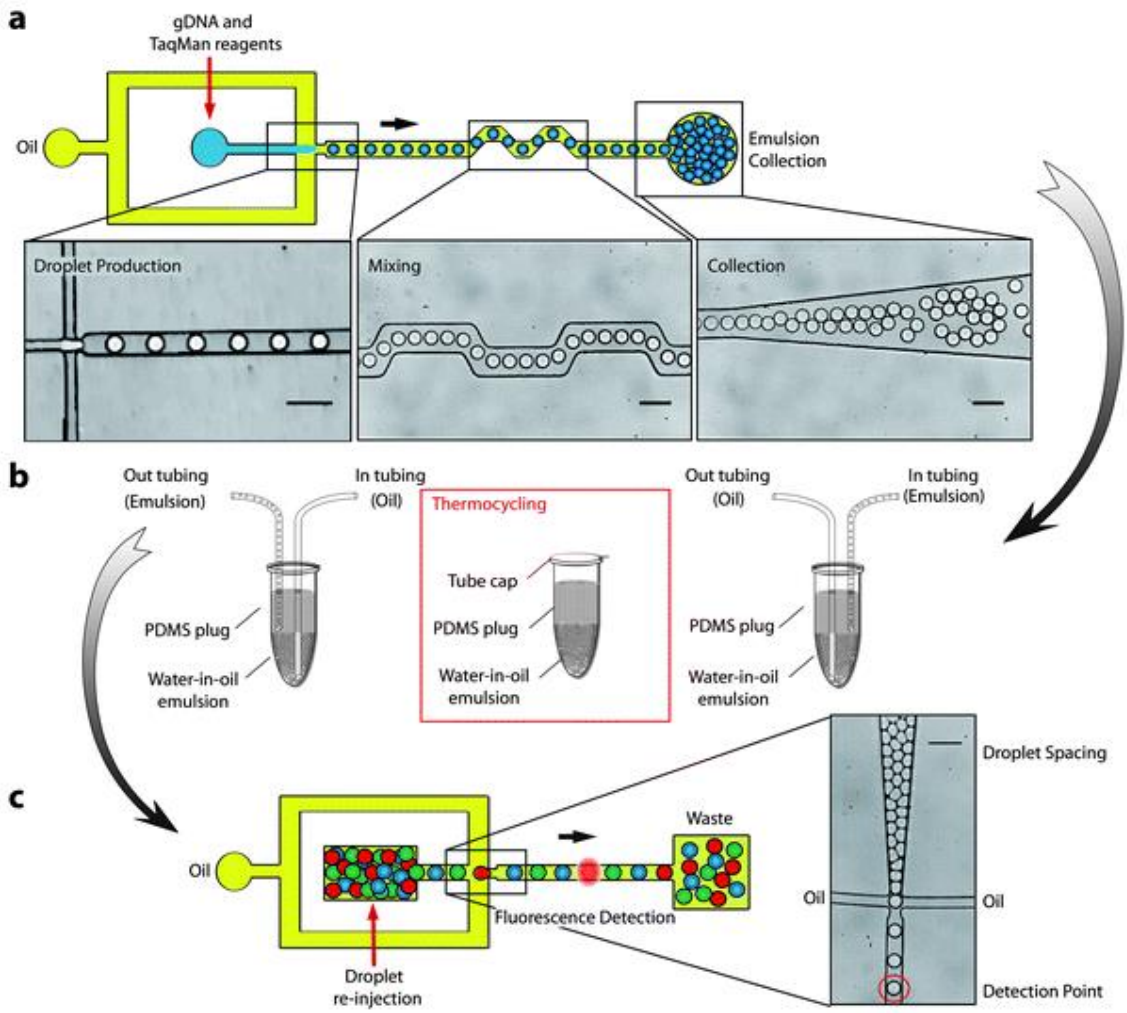


Figure 1.14. Présentation du système de dPCR en gouttes non commercial. A) Un mix contenant de l'ADN génomique, les réactifs PCR et des sondes fluorescentes de type TaqMan spécifiques de l'allèle normal ou muté est encapsulé dans des gouttes de manière à avoir moins d'un équivalent génomique par goutte. B) Les gouttes sont collectées dans un tube pour amplification PCR. C) Les gouttes sont réinjectées dans le dispositif microfluidique et testées individuellement en fluorescence. Tiré de Pekin et al.[133].

Parmi les études qui ont ciblé des allèles tumoraux, Huang et al. ont détecté du ctDNA extrait dans du plasma de patient atteint de carcinome hépatocellulaire[134]. Chez 27 patients parmi les 48 testés pour quatre points chauds de mutation, ils ont trouvé des allèles mutants présents à des fréquences entre 0,33 et 23,7 %. Hrebien et al. ont utilisé la dPCR pour analyser le ctDNA extrait chez une cohorte de 71 patients à des stades avancés de cancers du sein[94]. Brychta et al. ont quant à eux détecté des mutations KRAS dans le sang de 50 patients à des stades précoces de cancer dans 72 % des cas[135].

Récemment, en utilisant la dPCR, Sefrioui et al. ont même détecté pour la première fois des mutations de type KRAS, NRAS et BRAF dans du plasma non purifié de patients atteints de cancers

colorectaux[136]. Il faut toutefois interpréter ce résultat avec précaution parce que les patients étaient à des stades métastatiques du cancer (avec des charges importantes en cfDNA). En outre, le test s'est révélé particulièrement concluant pour des échantillons dont la fraction d'allèles mutants représentait plus de 0,5 % du total. Pour une analyse fiable du ctDNA, 200 à 2000 copies/µL étaient recommandées par le constructeur de la plateforme de dPCR (QuantStudio 3D Digital PCR System), nécessitant une étape de pré-amplification pour générer suffisamment de matériel. En procédant ainsi, ils ont tout de même accéléré la chaine analytique de 6 heures (pour du ctDNA extrait) à 4 heures (pour du plasma analysé directement).

Aujourd'hui, la dPCR apparait comme une technique prometteuse pour l'analyse du ctDNA. Même si elle ne permet de cibler que quelques séquences spécifiques, elle autorise la détection d'un mutant présent à une fréquence <0,01 % et l'amplification d'une molécule ou moins par compartiment permet une quantification absolue sans étalon. Toutefois, de nombreux efforts et des études cliniques restent à faire pour confirmer le potentiel de la dPCR pour le suivi en routine du cancer, notamment pour des patients présentent de faibles charges d'ADN circulant et d'ADN tumoral circulant.

1.3.4. Les opportunités pour de nouvelles technologies microfluidiques de concentration pour l'analyse de l'ADN résiduel

1.3.4.1. La microfluidique et les laboratoires sur puce

Dans sa revue pour Nature, Whitesides a défini la microfluidique comme la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides, de l'ordre du microlitre ou du nanolitre[112]. Dans les années 2000, la miniaturisation des dispositifs est impulsée par le succès des méthodes analytiques au format capillaire (comme la chromatographie en phase liquide à haute performance et l'électrophorèse capillaire), en prenant exemple sur les techniques de fabrication de la microélectronique. Le but était d'améliorer la sensibilité et la résolution des analyses. Pour l'analyse d'échantillons dilués, des fonctions de tri, de mélange, de concentration et de détection des analytes ont été développées. L'intégration de ces opérations de laboratoire dans un dispositif miniaturisé est à l'origine de la notion de laboratoire sur puce. Ces systèmes analytiques microfluidiques présentent l'avantage de consommer de petites quantités d'échantillons et de réactifs, d'être peu coûteux et jetables (notamment pour les dispositifs plastiques), et de réduire les temps tout en améliorant les performances d'analyse. Par ailleurs, la réduction des dimensions

permet le développement de systèmes portables pour réaliser des analyses sur site (analyses des eaux ou des sols) ou directement au chevet du patient (sur le principe des tests de grossesses ou du taux de glucose dans le sang pour les diabétiques). Un challenge de taille pour les laboratoires sur puce consiste à détecter des analytes très dilués à partir de faibles volumes d'échantillon. C'est le cas pour les analyses de biomarqueurs cancéreux circulants dans les fluides biologiques ou la détection de pathogènes dans les eaux par exemple. Par conséquent, diverses stratégies de pré-concentration avant analyse ont été développées pour faciliter la détection d'analytes dilués.

1.3.4.2. Les techniques microfluidiques de concentration de l'ADN

Les techniques de concentration d'analytes chargés peuvent être divisées en trois groupes en fonction de leur principe physique de fonctionnement[137]. Le premier groupe utilise des méthodes de stacking (empilement) comme le stacking d'échantillon par champ amplifié (FASS) ou l'isotachophorèse (ITP). Le second groupe utilise des méthodes de focalisation à l'équilibre dans un gradient de champ ; comme la focalisation par gradient de température ou la focalisation par gradient de champ hydrodynamique en solution viscoélastique. Un troisième groupe utilise des méthodes basées sur des mécanismes de capture, comme la capture électrocinétique (EKT), la capture diélectrophorétique (DEPT), la capture thermophorétique (TPT). Enfin d'autres méthodes repose sur des mécanismes à part, comme la concentration par évaporation ou par filtration. Il faut garder à l'esprit que la limite supérieure de concentration de l'ADN se situe à 10 µg/µL, ce qui représente sa limite de solubilité dans l'eau.

Les techniques peu adaptées à la concentration des acides nucléiques ne sont pas décrites en détail dans cette partie. Par exemple, les techniques d'immunocapture ou de focalisation isoélectrique par gradient de pH, ou de focalisation par gradient de champ électrique ont montré de bonnes performances pour la concentration de protéines. Les techniques de capture assistées par billes magnétiques sont plutôt adaptées à la concentration de cellules telles que les CTCs. Les méthodes de stacking par balayage micellaire sont quant à elles, plus adaptées à la concentration d'analytes neutres hydrophobes.

1.3.4.2.1. Les méthodes de stacking

Les méthodes de stacking sont fondées sur les différences de vitesse de migration des analytes en électrophorèse dans deux tampons de conductivité différentes. L'analyte est introduit dans une zone où sa vélocité est notée $V_{a,a}$ tandis que sa vélocité dans la zone de stacking est notée $V_{a,s}$ (Figure 1.15). A l'interface de ces deux zones, sa vélocité est V_b. Le stacking est dit proportionnel lorsque $0 < (V_{a,s} - V_b)/ (V_{a,a} - V_b) < 1$ et les analytes migrent dans la zone de stacking avec une baisse de la vitesse de migration qui provoque leur concentration. Le stacking est dit de frontière lorsque $(V_{a,s} - V_b)/ (V_{a,a} - V_b) < 0$ et les analytes sont concentrés dans une bande étroite statique à l'interface de la zone de l'analyte et de la zone de stacking.

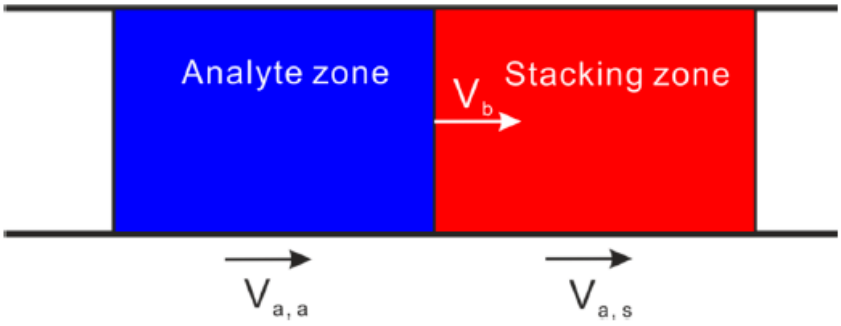


Figure 1.15. Représentation schématique du mécanisme de stacking via la manipulation de la vitesse de l'analyte. La vitesse de l'analyte est $V_{a,a}$ dans la zone de gauche. Sa vitesse est $V_{a,s}$ dans la zone de stacking. Sa vitesse est V_b à l'interface des deux zones.Tiré de Zhao et al.[137].

Nous avons vu précédemment que le stacking d'échantillon par amplification de champ (FASS) est communément utilisé pour préconcentrer des échantillons avant séparation par électrophorèse[138]. L'échantillon est préparé dans une solution avec une conductivité plus faible que la solution tampon de migration. Une partie du capillaire est remplie avec la solution d'échantillon de faible conductivité, tandis que le reste du capillaire est rempli avec le tampon de migration de forte conductivité. Ainsi une interface se créé à la frontière des solutions de conductivité différentes. La vélocité des analytes diminue quand ils sont transportés depuis la zone de faible conductivité vers la zone de forte conductivité. Ainsi les analytes s'accumulent dans une bande étroite dans la zone de forte conductivité. Zhang et al, ont notamment utilisé un FASS pour pré-concentrer jusqu'à 52 fois en 15 secondes des fragments d'ADN avant séparation en CE[139]. Toutefois cette méthode est contraignante car elle nécessite le recours à plusieurs tampons et à des échantillons peu salés.

La technique d'isotachophorèse (ITP) utilise des zones à mobilité ioniques variables pour focaliser l'échantillon et le séparer[140]. Trois électrolytes sont utilisés : un électrolyte guide (LE), un électrolyte de traîne (TE) et l'échantillon entre ces deux derniers. Les solutions de LE et TE ont

généralement un contre-ion (de polarité opposée à l'analyte) en commun et des co-ions (de polarité identique à l'analyte) différents. La mobilité ionique de l'analyte est plus grande que celle des co-ions du TE, mais plus faibles que celle des co-ions du LE. Lorsqu'un potentiel électrique est appliqué, un courant faible est généré dans le LE et un courant fort est généré dans le TE. Dans le TE, les analytes migrent plus vite que les co-ions, tandis que les analytes migrent moins vite dans le LE. Ainsi la différence de vélocité de l'analyte dans le LE et le TE provoque leur concentration à l'interface. La technique d'ITP a l'avantage de pouvoir être couplée à une séparation par électrophorèse capillaire ou une autre méthode de séparation[141]. Santiago et collègues ont montré la séparation d'un ladder (un marqueur de taille d'ADN) de 1 kb à 50 ng/mL en couplant une étape de préconcentration par ITP et une étape de séparation électrophorétique grâce à une ITP bidirectionnelle[142]. Par ailleurs, l'équipe de Santiago a également démontré l'extraction, la pré-concentration et la purification de l'ADN dans un échantillon sanguin par ITP[143] (Figure 1.16). Dans une autre revue, Bercovici et al précisent que la concentration en ADN dans la zone d'ITP peut être entre 10^3 et 10^4 fois supérieure à la concentration en ADN dans les zones de TE et LE[144]. Enfin, Li et al ont montré l'enrichissement par un facteur 100 de l'ADN en 4 minutes par ITP sur un support papier[145].

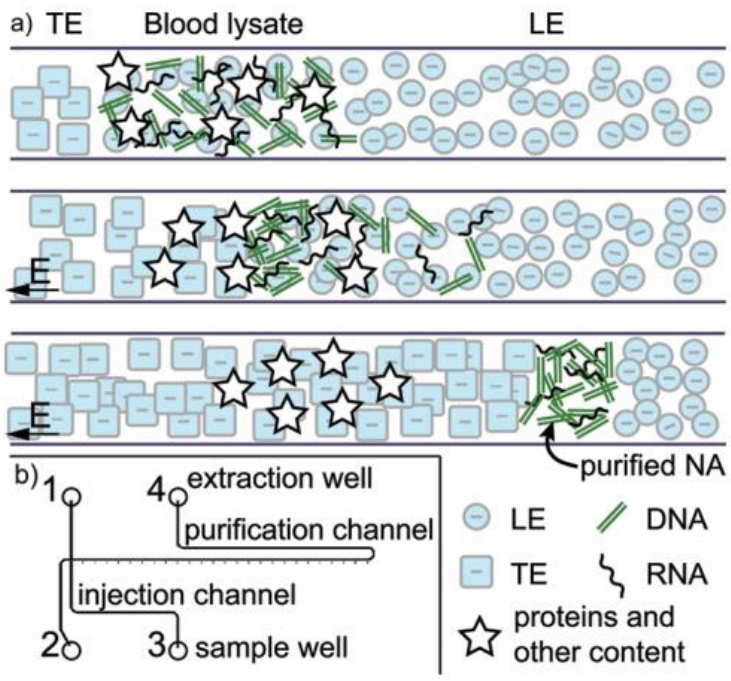


Figure 1.16. A) Purification d'acides nucléiques (NA) par ITP à partir d'un lysat sanguin. La mobilité de NA est plus faible que celle du LE et plus forte que celle du TE. Le TE a une mobilité plus forte que les protéines et les autres espèces chargées. Un plug de lysat sanguin est injecté entre le TE et le LE. Lors de l'application du champ électrique, les NA sont concentrés entre le TE et le LE, tandis que les protéines qui migrent plus lentement que l'interface ne sont pas concentrées. B) Design de la puce utilisée pour réaliser l'ITP. Tiré de Persat et al.[143].

1.3.4.2.2. Les méthodes de focalisation par gradient

Dans les méthodes de focalisation par gradient, l'analyte présent dans la solution migre à une vitesse $V_{a,a}$ dans les deux directions vers une zone de focalisation stationnaire, le résultat étant sa concentration[146] (Figure 1.17). Par conséquent, cette technique nécessite une variation de la vitesse de l'analyte en fonction de sa position dans le canal. Pour ce faire, il est possible d'utiliser plusieurs gradients de champs comme de champ électrique, de température ou de champ hydrodynamique. La différence principale avec les techniques de stacking est le mécanisme de transport des analytes dans la zone de concentration. En stacking, la vitesse de l'analyte est réduite à l'interface des deux solutions mais il n'y a pas de changement de sens pour cette vitesse, ce qui limite l'enrichissement. En focalisation, la concentration continue tant que le gradient de champ est appliqué et qu'il y a toujours un apport d'analyte. Dès lors, le facteur de concentration est déterminé par la vitesse à laquelle l'analyte migre vers la zone de focalisation et la durée de l'application du gradient de champ.

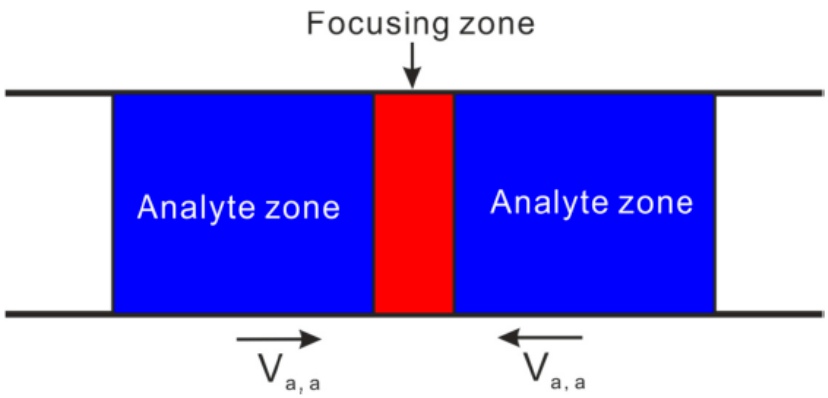


Figure 1.17. Représentation schématique du mécanisme de focalisation par gradient. L'analyte vers une zone stationnaire de focalisation à une vitesse $V_{a,a}$. Tiré de Zhao et al.[137].

La technique de focalisation par gradient de température (TGF) a été décrite par Ross et Locascio en 2002[95]. Elle permet de concentrer et séparer des analytes chargés en équilibrant le transport électrophorétique des analytes avec l'écoulement de la solution. Un gradient de température permet d'établir un gradient de vitesse électrophorétique dans un tampon spécifique dont la force ionique dépend de la température. L'analyte est alors arrêté à la position où la vitesse électrophorétique et la vitesse hydrodynamique se compensent. Cette technique a été utilisée pour la concentration d'espèces fluorescentes, d'acides aminés, de protéines et d'ADN. La température peut être contrôlée par des équipements externes au dispositif. Le chauffage par effet Joule cause

des phénomènes de convection interne à l'intérieur du canal pouvant être utilisés astucieusement pour la concentration et la séparation des analytes par TGF[147]. En utilisant une géométrie avec une soudaine expansion de la largeur du canal, et en optimisant les paramètres de voltage et de concentration du tampon, le groupe de Yang a amélioré significativement les performances de concentration par TGF (Figure 1.18). Avec ce système, il ont pu concentrer de l'ADN par un facteur 480 en 40 secondes[148].

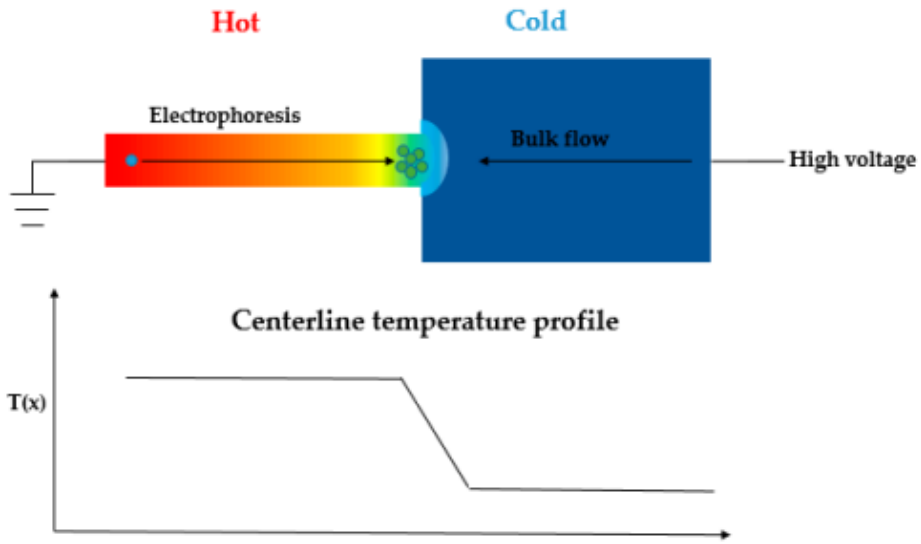


Figure 1.18. Design de système avec une expansion brutale de la largeur du canal pour la concentration par TGF. Adapté de Ge et al.[148].

Balss et al ont quant à eux développé un test d'hybridation de l'ADN en deux temps par TGF (Figure 1.19)[149]. Dans une première étape, des cibles d'ADN simple brin (ssDNA) sont enrichis par TGF dans un capillaire, puis des acides nucléiques peptidiques (PNA) sont transportés jusqu'aux ADN cibles pour hybridation. Dans un second temps, les complexes ADN/PNA sont focalisés par TGF dans la région froide du gradient de température, puis alors que l'écoulement les déplace vers la région de haute température, les complexes sont dénaturés, ce qui permet de déterminer leur température de fusion (déshybridation).

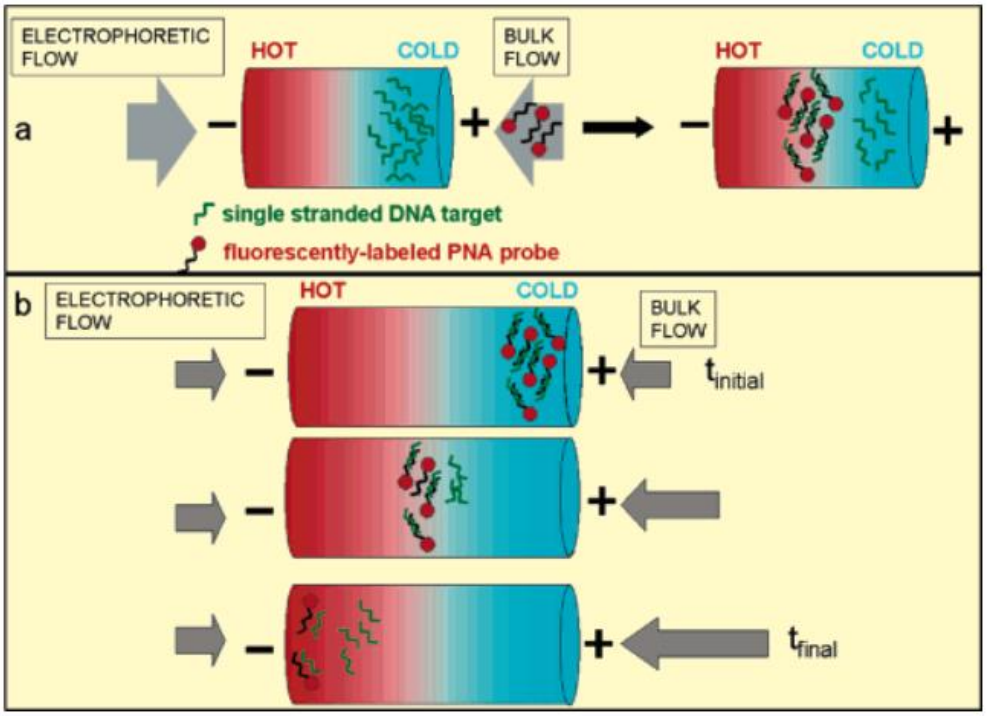


Figure 1.19. Principe du double test par TGF. A) Des cibles d'ADN simples brins sont focalisées par TGF et s'hybrident avec des sondes PNA. B) Le complexe DNA/PNA est focalisé par TGF dans la région froide. Lors de l'écoulement vers la région chaude, la dénaturation des complexes informe sur sa température de fusion. Tiré de Balss et al.[149].

Cette technique est intéressante pour les tests ADN car elle permet de pré-concentrer les cibles ADN à une position spécifique, facilitant la réaction avec des sondes. Enfin le complexe sonde/cible peut être à son tour enrichi et séparé avant la détection. Cette méthode est toutefois limitée à la concentration et la séparation de 2-3 analytes simultanément. De plus, elle nécessite également le recours à des tampons spécifiques, un contrôle précis de la température et de hautes tensions de fonctionnement (~1000 V). Normalement, la concentration en analytes est bien plus faible que la concentration en ions du tampon. Cependant lorsque l'analyte est accumulé à de fortes concentrations, des interactions non linéaires entre l'analyte et les ions du tampon peuvent provoquer des glissements de bandes et des distorsions indésirables pour la détection et la résolution[150]. Enfin cette technique est difficilement intégrable dans des dispositifs portables car elle utilise généralement des contrôleurs externes de température.

Il est également possible d'utiliser un gradient hydrodynamique et électrophorétique pour réaliser une concentration. Ce mécanisme sera présenté plus en détail dans la suite de ce manuscrit car il est utilisé par le système µLAS (micro Laboratoire pour l'Analyse et la Séparation de l'ADN) développé pendant cette thèse[151]. Brièvement, le gradient de vitesse hydrodynamique et électrophorétique est généralement modulé par la géométrie du canal. Par exemple, l'introduction

d'une constriction plus ou moins abrupte dans le canal permet d'accentuer le profil de vitesse de l'écoulement pour respecter la conservation du débit[151,152]. Lorsque l'on génère un écoulement hydrodynamique en opposition à un courant électrique dans une solution viscoélastique, il résulte une force transverse normale à la direction de l'écoulement, qui plaque les molécules chargées à la paroi du canal. L'ADN s'accumule alors à une position d'équilibre du canal où les forces électrophorétiques et hydrodynamiques se compensent. En amont ou en aval de cette position d'équilibre, l'ADN est transporté par la domination de la vitesse hydrodynamique ou électrophorétique, respectivement. En utilisant ce système, Ranchon et al, ont démontré l'enrichissement de l'ADN d'un facteur 723 par minute. A la différence des autres techniques de concentration, l'utilisation d'un gradient hydrodynamique permet la concentration sélective des molécules d'ADN en fonction de leurs tailles. Ainsi les opérations de concentration et de séparation se font simultanément sans avoir besoin de recourir à une séparation séquentielle par électrophorèse.

1.3.4.2.3. Les méthodes de capture

La capture électrocinétique (EKT) résulte de la polarisation de la concentration en ions à proximité de membranes sélectives d'ions ou à la jonction de microcanaux et nanocanaux. La Figure 1.20 illustre un système classique de concentration par EKT. Deux canaux sont connectés par une membrane ou un nanopore. Sous l'action de plusieurs champs électriques, une polarisation de la concentration en ions au niveau de la membrane (dans la plupart des cas, la membrane à une charge de surface négative, de manière à ce que seul les cations puisse passer à travers) provoque la formation d'une zone enrichie en ion (cations) dans le canal du bas et d'une zone déplétée en ion (cations) dans le canal du haut. La zone de déplétion en ions limite le passage d'espèces chargées (comme de l'ADN chargé négativement), provoquant leur accumulation en amont de cette zone.

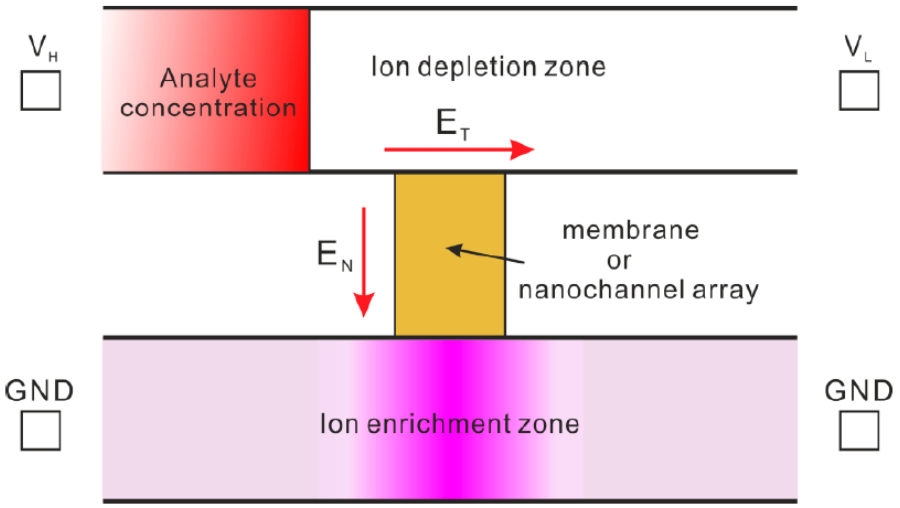


Figure 1.20. Représentation schématique d'un dispositif de capture électrocinétique. La formation d'une zone de déplétion en ions provoque la concentration des espèces chargées en amont de cette dernière. Tiré de Zhao et al.[137].

En utilisant cette méthode, Dai et al ont obtenu un facteur d'enrichissement de 800 pour un ADN de 20 bases en 300 secondes[153]. En utilisant un système d'EKT par amplification de champ, Hahn et al ont enrichi un fragment d'ADN de 230 paires de bases avec un facteur d'enrichissement de près de 80 en 300 secondes par exclusion de charges au niveau de la membrane. Cependant après 300 secondes de concentration, ils ont observé le passage de molécules à travers la membrane[154].

Les techniques de capture diélectrophorétiques (DEPT) utilisent des champs électriques non uniformes**.** Asbury et al. ont utilisé une force diélectrophorétique pour concentrer de l'ADN dans des champs électriques alternatifs non uniformes[155]. Pour ce faire, ils ont conçu un réseau d'électrodes coplanaires. Les molécules d'ADN sont capturées au niveau du bord des électrodes où les lignes de champ électrique sont très denses (Figure 1.21).

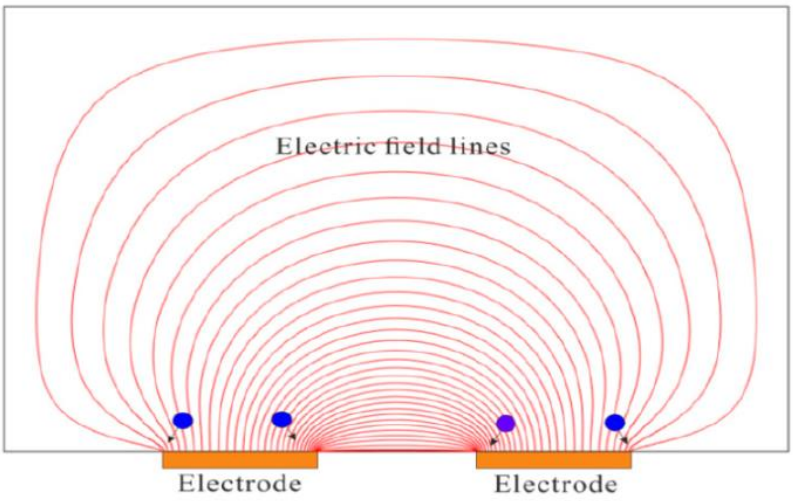


Figure 1.21. Représentation schématique de deux électrodes coplanaires utilisées pour la capture diélectrophorétique et de leurs lignes de champs. L'ADN est capturé au bord des électrodes où les lignes de champs sont plus denses. Tiré de Zhao et al.[137].

Du el al ont utilisé une plateforme de quatre électrodes pour concentrer de l'ADN en combinant des effets d'écoulement sélectro-osmotiques pour amener les molécules d'ADN au niveau des électrodes, et des effets diélectrophorétiques pour leur capture[156]. En amenant rapidement le matériel au niveau des électrodes, ils ont obtenu un facteur 40 de concentration en seulement 2 secondes. Pour créer des champs électriques non uniformes, une alternative consiste à introduire des structures isolantes dans le canal comme des réseaux de piliers isolants[157]. Chou et al, ont quant à eux utilisé des constrictions isolantes pour capture des molécules d'ADN avec des courants alternatifs[158].

La capture thermophorétique (TPT) utilise le transport des molécules en réponse à un gradient de température pour réaliser une concentration. Braun et Libchaber ont démontré la concentration de l'ADN en combinant un effet de déplétion thermophorétique avec un effet de convection thermique[159]. En utilisant un laser pour chauffer une zone, ils ont généré une force thermophorétique, qui provoque une zone de déplétion de l'ADN. Consécutivement, un effet de convection thermique contre la déplétion en transportant l'ADN vers le point chaud. La combinaison de ses deux effets crée une zone de stagnation à la circonférence du point chaud où l'ADN est concentré. En procédant ainsi, ils ont concentré plus de 1000 fois l'ADN en 180 secondes. En remplaçant la convection thermique par un écoulement pour contrer l'effet de thermophorèse, Duhr and Braun ont établi théoriquement que pour un transport rapide des molécules, l'ADN pouvait être enrichi jusqu'à 800 fois en 15 minutes [160].

1.3.4.2.4. Autres techniques de concentration

Il existe d'autres techniques de concentration électrocinétiques. Khandurina et al ont utilisé une membrane poreuse pour ralentir le transport de larges molécules comme l'ADN et provoquer sa concentration à l'entrée de la membrane[161]. Ils ont montré l'enrichissement de l'ADN par un facteur 100 en 3 minutes. Dhopeshwarkar et al, ont utilisé des matrices d'hydrogels pour concentrer de l'ADN simple brin par un facteur supérieur à 500 en 150 secondes[162]. Kuo et al ont réalisé une puce électrophorétique pour la préconcentration et la séparation d'ADN en utilisant un système de valves fermées[163]. Dans leur système, l'ADN chargé était retenu par un nanocanal formé par la valve fermée avec des charges de surface anioniques. En 100 secondes ils obtenu un facteur d'enrichissement de l'ADN de 41. Dans une autre étude, Kuo et al ont concentré et séparé de l'ADN sur une colonne par électrophorèse en utilisant un gradient de polymère[164]. Wanunu et al ont montré qu'un gradient ionique permettait d'améliorer la concentré de l'ADN au niveau de nanopores[165]. Paik et al ont quant à eux utilisé des nanopores à ouverture contrôlée électriquement pour concentrer de l'ADN[166]. Park et Swerdlow ont concentré des fragments d'ADN dans une bande en opposant un écoulement avec un fort courant électrique[167]. Daghighi et Li ont ont utilisé des effets combinés d'écoulement électroosmotique, d'électrophorèse et d'écoulement sous pression pour concentrer par un facteur 91 de l'ADN en 115 secondes[168]. Walker et Beebe ont utilisé un mécanisme d'évaporation pour concentrer des analytes dans un microcanal[169].

Par ailleurs, même si les facteurs de concentration sont souvent limités, il est également possible de capturer de l'ADN sur des billes magnétiques ou des surfaces fonctionnalisées et de contrôler leur libération dans plus petit volume pour réaliser une concentration. Mosley et al. se sont servis de cette technique pour extraire de l'ADN de selles notamment[35]. L'extraction en phase solide est notamment le procédé utilisé dans de nombreux protocoles de purification de l'ADN. Les molécules d'ADN d'une solution sont isolées des autres composés par adsorption à une matrice, puis elles sont éluées dans un tampon de volume choisi. La réduction de volume entre la solution de départ et la solution d'élution peut permettre d'atteindre des facteurs d'enrichissement supérieurs à 500.

Pour la Figure 1.22, nous avons représenté les facteurs de concentration en fonction du temps de concentration pour les principales techniques de concentration microfluidique. Les valeurs de concentration correspondent aux plus grandes valeurs documentées dans la littérature pour chaque technique. La présence d'une technique en haut à gauche du graphe suggère de bonnes performances de concentration. En suivant cette logique, la technique µLAS développée au sein du

LAAS présente des performances de concentration élevées. En combinaison avec les avantages et inconvénient de chaque technique relevés dans le Tableau 1.5, la Figure 1.22 peut guider le choix de l'utilisateur vers une technique microfluidique de concentration en fonction de l'application visée.

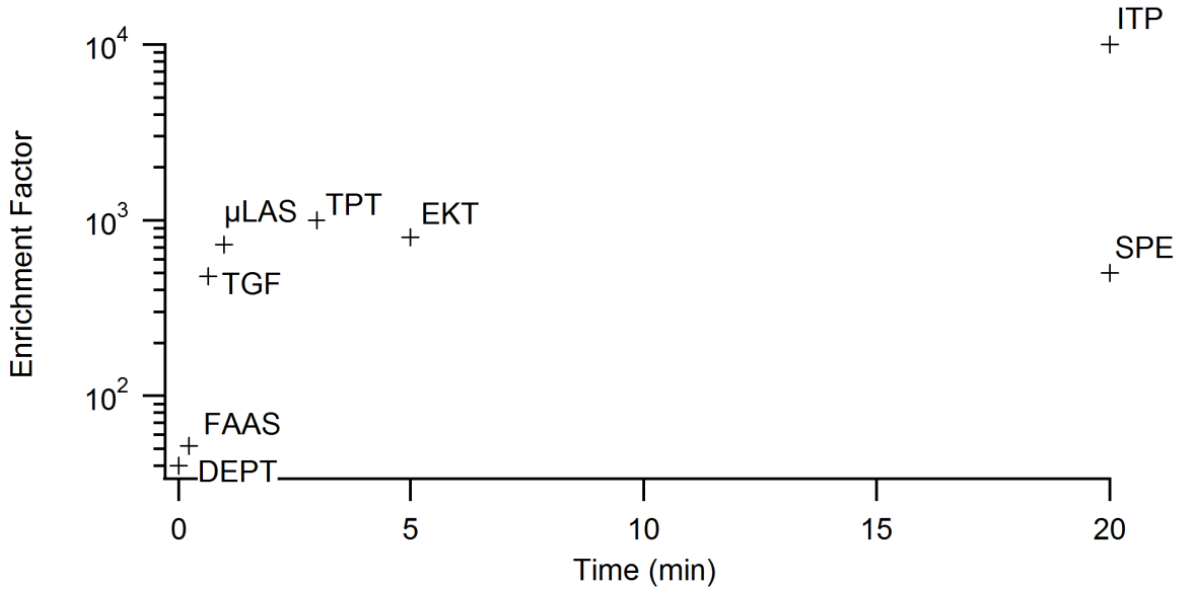


Figure 1.22. Facteurs de concentration en fonction du temps de concentration pour différentes techniques de concentration microfluidiques.

Le Tableau 1.5 reprend les principales techniques développées pour concentrer de l'ADN. Les facteurs d'enrichissements maximum atteints ainsi que les avantages et les inconvénients de ces techniques sont présentés. Généralement, dans un premier temps les performances de concentration des différentes techniques sont limitées par la vitesse à laquelle les molécules sont transportées vers la zone de concentration. Dans un second temps, lorsque la concentration locale en espèces chargées devient trop importante, l'enrichissement peut être perturbé (du champ électrique localement par exemple).

Tableau 1.5. Présentation des principales techniques de concentration de l'ADN avec les facteurs d'enrichissement maximum observés et leurs avantages et inconvénients.

Mécanisme	Technique	Facteur d'enrichissment	Avantages	Inconvénients
Stacking	Stacking d'échantillon par amplification de champ (FAAS)	52 (15 sec)	Compatible avec une fonction de séparation	2 solutions tampons différentes Longs canaux Concentration limitée par le ratio de changement de vitesse de l'analyte
	Isotachophorèse (ITP)	10000 (20 min)	Compatible avec une fonction de séparation	Longs canaux Concentration limitée par le ratio de changement de vitesse de l'analyte
Focalisation	Focalisation par gradient de température (TGF)	480 (40 sec)	Microcanaux relativement courts Pas d'électrodes, de membranes, ou de nanostructures Séparation possible	Tampons spéciaux Haut voltages de fonctionnement (~1000 V) Contrôle précis de la température Difficile à intégrer dans un dispositif portable
	Focalisation par gradient de champ hydrodynamique en solution viscoélastique	723 (1 min)	Microcanaux relativement courts et simples Pas de membranes ou de nanostructures **Permet la concentration et la séparation simultanée de l'ADN**	Tampon viscoélastique
Capture	Capture électrocinétique (EKT)	800 (300 sec)		Incorporation de membranes ou fabrication complexe de nanocanaux
	Capture diélectrophorétique (DEPT)	40 (2 sec)	Possibilité de production en masse à faible coût	Concentration uniquement à proximité des électrodes, limitant les facteurs d'enrichissement
	Capture thermophorétique (TPT)	>1000 (3 min)		Difficile de manipuler l'ADN concentré
	Extraction en phase solide (SPE)	>500 (20 min)		Introduction d'une chimie de capture et de

				libération appropriée dans le canal
Autres	Matrices poreuses	500 (150 sec)		Introduction d'hydrogels ou de membranes
	Evaporation	<10 (30 min)	Pas d'équipements externes Evaporation constante Indépendante de type d'échantillons et de la charge	Long
	Filtration par exclusion de taille	100 (3 min)		Introduction d'une membrane

Conclusion du chapitre 1

Dans ce chapitre nous avons introduit les différentes techniques et technologies pertinentes pour l'analyse de l'ADN résiduel, à travers l'exemple applicatif de l'ADN circulant dans le sang. Nous avons vu que la concentration, la taille et les séquences de l'ADN circulant pouvaient servir de biomarqueur pour le diagnostic et le suivi du cancer. Nous avons vu que les technologies d'électrophorèse capillaires et microfluidiques sont de plus en plus sensibles. Des appareils commerciaux tels que le Fragment Analyzer ou le Bioanalyzer permettent l'analyse des échantillons les plus concentrés. Par ailleurs le développement des techniques de PCR digitale a permis de détecter de faibles fractions de séquences mutées. Toutefois, des limitations demeurent pour l'analyse en routine de l'ADN circulant. Elle requiert notamment la standardisation des étapes pré-analytiques et analytiques des échantillons. Des systèmes encore plus sensibles permettraient d'analyser les échantillons les moins concentrés même à des stades précoces de la maladie. Enfin aujourd'hui, aucune méthode ne permet d'analyser des échantillons sanguins ou plasmatiques directement sans extraction de l'ADN. Au-delà de la praticité et du gain de temps, la détection directe permettrait de limiter la perte de matériel et d'information.

Dans le chapitre 2 de ce manuscrit, nous allons présenter plus en détail la technologie µLAS, développée au sein de l'équipe, qui permet la concentration et la séparation simultanée de l'ADN. Ces opérations sont pertinentes pour l'analyse de l'ADN circulant. Nous nous appliquerons notamment à décrire le principe de fonctionnement et les performances de µLAS.

Références du chapitre 1

1. Zink, D., Fische, A. H. & Nickerson, J. A. Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 677–687 (2004).
2. Muller, H. J. ARTIFICIAL TRANSMUTATION OF THE GENE. *Science* **66,** 84–87 (1927).
3. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194,** 23–28 (1976).
4. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366,** 883–892 (2012).
5. Knudson, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68,** 820–823 (1971).
6. Loeb, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* **51,** 3075–3079 (1991).
7. Shih, C. & Weinberg, R. A. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29,** 161–169 (1982).
8. Sherr, C. J. Principles of tumor suppression. *Cell* **116,** 235–246 (2004).
9. Garraway, L. A., Verweij, J. & Ballman, K. V. Precision Oncology: An Overview. *J. Clin. Oncol.* **31,** 1803–1805 (2013).
10. Yong, E. Cancer biomarkers: Written in blood. *Nat. News* **511,** 524 (2014).
11. Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A. & Anker, P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta* **313,** 139–142 (2001).
12. Mandel, P. & Metais, P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **142,** 241–243 (1948).
13. Bendich, A., Wilczok, T. & Borenfreund, E. Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science* **148,** 374–376 (1965).

14. Lo, Y. M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet Lond. Engl.* **350,** 485–487 (1997).

15. Van der Vaart, M. & Pretorius, P. J. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1137,** 18–26 (2008).

16. Zonta, E., Nizard, P. & Taly, V. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. in *Advances in Clinical Chemistry* **70,** 197–246 (Elsevier, 2015).

17. Diaz, L. A. & Bardelli, A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* **32,** 579–586 (2014).

18. Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284,** 555–556 (1980).

19. Jahr, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* **61,** 1659–1665 (2001).

20. Diehl, F. *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 16368–16373 (2005).

21. Diehl, F. *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* **14,** 985–990 (2008).

22. Bettegowda, C. *et al.* Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6,** 224ra24-224ra24 (2014).

23. Newman, A. M. *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.* **20,** 548–554 (2014).

24. Pantel, K. Blood-Based Analysis of Circulating Cell-Free DNA and Tumor Cells for Early Cancer Detection. *PLOS Med.* **13,** e1002205 (2016).

25. Koyanagi, K. Association of Circulating Tumor Cells with Serum Tumor-Related Methylated DNA in Peripheral Blood of Melanoma Patients. *Cancer Res.* **66,** 6111–6117 (2006).

26. Umetani, N. *et al.* Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24,** 4270–4276 (2006).

27. Wang, Y. *et al.* Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci. Transl. Med.* **7,** 293ra104 (2015).

28. Wei, F. *et al.* Noninvasive saliva-based EGFR gene mutation detection in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190,** 1117–1126 (2014).

29. Li, Y., Zhou, X., St John, M. a. R. & Wong, D. T. W. RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *J. Dent. Res.* **83,** 199–203 (2004).

30. Humeau, M. *et al.* Salivary MicroRNA in Pancreatic Cancer Patients. *PLoS ONE* **10,** (2015).

31. Millholland, J. M., Li, S., Fernandez, C. A. & Shuber, A. P. Detection of low frequency FGFR3 mutations in the urine of bladder cancer patients using next-generation deep sequencing. *Res. Rep. Urol.* **4,** 33–40 (2012).

32. Pan, W., Gu, W., Nagpal, S., Gephart, M. H. & Quake, S. R. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin. Chem.* **61,** 514–522 (2015).

33. De Mattos-Arruda, L. *et al.* Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat. Commun.* **6,** 8839 (2015).

34. Diehl, F. *et al.* Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* **135,** 489–498 (2008).

35. Mosley, O. *et al.* Sample introduction interface for on-chip nucleic acid-based analysis of Helicobacter pylori from stool samples. *Lab Chip* **16,** 2108–2115 (2016).

36. Soh, J. *et al.* Usefulness of EGFR mutation screening in pleural fluid to predict the clinical outcome of gefitinib treated patients with lung cancer. *Int. J. Cancer* **119,** 2353–2358 (2006).

37. Martinez-Lopez, J. *et al.* Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* **123,** 3073–3079 (2014).

38. Jung, M., Klotzek, S., Lewandowski, M., Fleischhacker, M. & Jung, K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin. Chem.* **49,** 1028–1029 (2003).

39. El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F. & Thierry, A. R. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **424,** 222–230 (2013).

40. Wang, Y. *et al.* Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112,** 9704–9709 (2015).

41. Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S. & Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2017). doi:10.1038/nrclinonc.2017.14

42. Hoque, M. O. *et al.* Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res.* **64,** 5511–5517 (2004).

43. Tsui, N. B. Y. *et al.* High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *PloS One* **7,** e48319 (2012).

44. Ashworth, T. R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Australian Medical Journal* 146–149 (1869).

45. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* **133,** 571–573 (1889).

46. Haber, D. A. & Velculescu, V. E. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* **4,** 650–661 (2014).

47. Krebs, M. G. *et al.* Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11,** 129–144 (2014).

48. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* **14,** 623–631 (2014).

49. Lin, H. K. *et al.* Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **16,** 5011–5018 (2010).

50. Generation of Prostate Cancer Patient Derived Xenograft Models from Circulating Tumor Cells. - PubMed - NCBI. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555435. (Accessed: 1st August 2017)

51. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33,** 967–978 (1983).

52. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21,** 575–581 (2009).

53. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* **73,** 1907–1920 (2010).

54. Zhang, J. *et al.* Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13,** 17–24 (2015).

55. Rani, S. *et al.* Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **784,** 181–195 (2011).

56. Stevens, G. L., Scheer, W. D. & Levine, E. A. Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **5,** 293–296 (1996).

57. Taylor, D. D. & Gercel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **110,** 13–21 (2008).

58. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **13,** 423–433 (2011).

59. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105,** 10513–10518 (2008).

60. Ono, S., Lam, S., Nagahara, M. & Hoon, D. S. B. Circulating microRNA Biomarkers as Liquid Biopsy for Cancer Patients: Pros and Cons of Current Assays. *J. Clin. Med.* **4,** 1890–1907 (2015).

61. Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. A. & Pantel, K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11,** 145–156 (2014).

62. Hanash, S. M., Pitteri, S. J. & Faca, V. M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature* **452,** 571–579 (2008).

63. Chignard, N. *et al.* Cleavage of endoplasmic reticulum proteins in hepatocellular carcinoma: Detection of generated fragments in patient sera. *Gastroenterology* **130,** 2010–2022 (2006).

64. Carter, H. B. *et al.* Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J. Urol.* **190,** 419–426 (2013).

65. Welch, H. G., Schwartz, L. M. & Woloshin, S. Prostate-specific antigen levels in the United States: implications of various definitions for abnormal. *J. Natl. Cancer Inst.* **97,** 1132–1137 (2005).

66. Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer* **5,** 845–856 (2005).

67. Heidenreich, A. *et al.* Early detection of prostate cancer: European Association of Urology recommendation. *Eur. Urol.* **64,** 347–354 (2013).

68. Locker, G. Y. *et al.* ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24,** 5313–5327 (2006).

69. Dawson, S.-J. *et al.* Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **368,** 1199–1209 (2013).

70. Anker, P., Mulcahy, H. & Stroun, M. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: Time for large-scale clinical studies? *Int. J. Cancer* **103,** 149–152 (2003).

71. Fleischhacker, M. & Schmidt, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim. Biophys. Acta* **1775,** 181–232 (2007).

72. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37,** 646–650 (1977).

73. Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E. M. & Leon, S. A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* **51,** 2116–2120 (1983).

74. Flamini, E. *et al.* Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12,** 6985–6988 (2006).

75. Lecomte, T., Ceze, N., Dorval, E. & Laurent-Puig, P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **34,** 662–681 (2010).

76. Mouliere, F. *et al.* High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLOS ONE* **6,** e23418 (2011).

77. Underhill, H. R. *et al.* Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet* **12,** e1006162 (2016).

78. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* **11,** 426–437 (2011).

79. Wang, B. G. *et al.* Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* **63,** 3966–3968 (2003).

80. Boynton, K. A., Summerhayes, I. C., Ahlquist, D. A. & Shuber, A. P. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Clin. Chem.* **49,** 1058–1065 (2003).

81. Gilbert, M. T. P. *et al.* The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PloS One* **2,** e537 (2007).

82. Weaver, K. D., Grossman, S. A. & Herman, J. G. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma. *Cancer Invest.* **24,** 35–40 (2006).

83. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339,** 1546–1558 (2013).

84. Diaz, L. A. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **486,** 537–540 (2012).

85. Murtaza, M. *et al.* Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* **497,** 108–112 (2013).

86. Jung, K., Fleischhacker, M. & Rabien, A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—A critical appraisal of the literature. *Clin. Chim. Acta* **411,** 1611–1624 (2010).

87. Elshimali, Y., Khaddour, H., Sarkissyan, M., Wu, Y. & Vadgama, J. The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **14,** 18925–18958 (2013).

88. Devonshire, A. S. *et al.* Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **406,** 6499–6512 (2014).

89. Wu, T.-L. *et al.* Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **321,** 77–87 (2002).

90. Jen, J., Wu, L. & Sidransky, D. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **906,** 8–12 (2000).

91. Mauger, F., Dulary, C., Daviaud, C., Deleuze, J.-F. & Tost, J. Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **407,** 6873–6878 (2015).

92. Lam, N. Y. L. EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clin. Chem.* **50,** 256–257 (2004).

93. Madisen, L. *et al.* The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am. J. Med. Genet.* **27,** 379–390 (1987).

94. Hrebien, S. *et al.* Reproducibility of Digital PCR Assays for Circulating Tumor DNA Analysis in Advanced Breast Cancer. *PloS One* **11,** e0165023 (2016).

95. Chiu, R. W. K. *et al.* Effects of Blood-Processing Protocols on Fetal and Total DNA Quantification in Maternal Plasma. *Clin. Chem.* **47,** 1607–1613 (2001).

96. Swinkels, D. W., Wiegerinck, E., Steegers, E. A. P. & Kok, J. B. de. Effects of Blood-Processing Protocols on Cell-free DNA Quantification in Plasma. *Clin. Chem.* **49,** 525–526 (2003).

97. Sozzi, G. *et al.* Effects of Prolonged Storage of Whole Plasma or Isolated Plasma DNA on the Results of Circulating DNA Quantification Assays. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **97,** 1848–1850 (2005).

98. Glasel, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* **18,** 62–63 (1995).

99. Osborn, J. A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science applications—Part I: Blotting techniques. in *Innovations Forum Life Science News 6, Amersham Pharmacia Biotech. 1* **4,** (2000).

100. Mansfield, E. S. *et al.* Nucleic acid detection using non-radioactive labelling methods. *Mol. Cell. Probes* **9,** 145–156 (1995).

101. Hilario, E. End labeling procedures: an overview. *Mol. Biotechnol.* **28,** 77–80 (2004).

102. Rengarajan, K., Cristol, S. M., Mehta, M. & Nickerson, J. M. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol. Vis.* **8,** 416–421 (2002).

103. Piehler, J. *et al.* Label-Free Monitoring of DNA?Ligand Interactions. *Anal. Biochem.* **249,** 94–102 (1997).

104. Pérez-Barrios, C. *et al.* Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl. Lung Cancer Res.* **5,** 665–672 (2016).

105. Breitbach, S. *et al.* Direct Quantification of Cell-Free, Circulating DNA from Unpurified Plasma. *PLOS ONE* **9,** e87838 (2014).

106. Stellwagen, N. C., Gelfi, C. & Righetti, P. G. The free solution mobility of DNA. *Biopolymers* **42,** 687–703 (1997).

107. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. & Kim, Y. H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp. JoVE* (2012). doi:10.3791/3923

108. Albarghouthi, M. N. & Barron, A. E. Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21,** 4096–4111 (2000).

109. Breadmore, M. C. & Haddad, P. R. Approaches to enhancing the sensitivity of capillary electrophoresis methods for the determination of inorganic and small organic anions. *Electrophoresis* **22,** 2464–2489 (2001).

110. Shihabi, Z. K. REVIEW OF APPLICATIONS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR CLINICAL ANALYSIS. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **23,** 79–95 (2000).

111. Swerdlow, H. & Gesteland, R. Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **18,** 1415–1419 (1990).

112. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442,** 368–373 (2006).

113. Woolley, A. T. & Mathies, R. A. Ultra-High-Speed DNA Sequencing Using Capillary Electrophoresis Chips. *Anal. Chem.* **67,** 3676–3680 (1995).

114. Barry, A. & Cohen, S. Quality Assessment of Genomic DNA Degradation: Alternative to Gel Electrophoresis Overcomes Limitations of Traditional Methods. *Genet. Eng. Biotechnol. News* **33,** 28–28 (2013).

115. Sun, M., Lin, J. S. & Barron, A. E. Ultrafast, efficient separations of large-sized dsDNA in a blended polymer matrix by microfluidic chip electrophoresis: A design of experiments approach. *ELECTROPHORESIS* **32,** 3233–3240 (2011).

116. Wu, D., Qin, J. & Lin, B. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *J. Chromatogr. A* **1184,** 542–559 (2008).

117. Volkmuth, W. D. & Austin, R. H. DNA electrophoresis in microlithographic arrays. *Nature* **358,** 600–602 (1992).

118. Kaji, N. *et al.* Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field. *Anal. Chem.* **76,** 15–22 (2004).

119. Huang, L. R. *et al.* A DNA prism for high-speed continuous fractionation of large DNA molecules. *Nat. Biotechnol.* **20,** 1048–1051 (2002).

120. Gumuscu, B., Bomer, J. G., de Boer, H. L., van den Berg, A. & Eijkel, J. C. T. Exploiting biased reptation for continuous flow preparative DNA fractionation in a versatile microfluidic platform. *Microsyst. Nanoeng.* **3,** 17001 (2017).

121. Dorfman, K. D. DNA electrophoresis in microfabricated devices. *Rev. Mod. Phys.* **82,** 2903–2947 (2010).

122. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Nat. Biotechnol.* **10,** 413–417 (1992).

123. Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. & Caskey, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* **16,** 11141–11156 (1988).

124. Sunami, E., Vu, A.-T., Nguyen, S. L., Giuliano, A. E. & Hoon, D. S. B. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1137,** 171–174 (2008).

125. Batzer, M. A. & Deininger, P. L. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat. Rev. Genet.* **3,** 370–379 (2002).

126. Didelot, A. *et al.* Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin. Chem.* **59,** 815–823 (2013).

127. Pinzani, P. *et al.* Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **412,** 2141–2145 (2011).

128. Baker, M. Digital PCR hits its stride. *Nat. Methods* **9,** 541–544 (2012).

129. Sykes, P. J. *et al.* Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* **13,** 444–449 (1992).

130. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 9236–9241 (1999).

131. Morley, A. A. Digital PCR: A brief history. *Biomol. Detect. Quantif.* **1,** 1–2 (2014).

132. Taly, V., Pekin, D., Abed, A. E. & Laurent-Puig, P. Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol. Med.* **18,** 405–416 (2012).

133. Pekin, D. *et al.* Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab. Chip* **11,** 2156–2166 (2011).

134. Huang, A. *et al.* Detecting Circulating Tumor DNA in Hepatocellular Carcinoma Patients Using Droplet Digital PCR Is Feasible and Reflects Intratumoral Heterogeneity. *J. Cancer* **7,** 1907–1914 (2016).

135. Brychta, N., Krahn, T. & Ahsen, O. von. Detection of *KRAS* Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer. *Clin. Chem.* **62,** 1482–1491 (2016).

136. Sefrioui, D. *et al.* Direct circulating tumor DNA detection from unpurified plasma using a digital PCR platform. *Clin. Biochem.* (2017). doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.06.005

137. Zhao, C., Ge, Z. & Yang, C. Microfluidic Techniques for Analytes Concentration. *Micromachines* **8,** 28 (2017).

138. Kitagawa, F. & Otsuka, K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1335,** 43–60 (2014).

139. Zhang, S., Jiang, C. & Jia, L. Tetrabutylammonium phosphate-assisted separation of multiplex polymerase chain reaction products in non-gel sieving capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* **408,** 284–288 (2011).

140. Gebauer, P. & Boček, P. Recent progress in capillary isotachophoresis. *ELECTROPHORESIS* **23,** 3858–3864 (2002).

141. Bahga, S. S. & Santiago, J. G. Coupling isotachophoresis and capillary electrophoresis: a review and comparison of methods. *The Analyst* **138,** 735–754 (2013).

142. Bahga, S. S., Han, C. M. & Santiago, J. G. Integration of rapid DNA hybridization and capillary zone electrophoresis using bidirectional isotachophoresis. *Analyst* **138,** 87–90 (2012).

143. Persat, A., Marshall, L. A. & Santiago, J. G. Purification of nucleic acids from whole blood using isotachophoresis. *Anal. Chem.* **81,** 9507–9511 (2009).

144. Bercovici, M., Han, C. M., Liao, J. C. & Santiago, J. G. Rapid hybridization of nucleic acids using isotachophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109,** 11127–11132 (2012).

145. Li, X., Luo, L. & Crooks, R. M. Low-Voltage Paper Isotachophoresis Device for DNA Focusing. *Lab. Chip* **15,** 4090–4098 (2015).

146. Ivory, C. F. Several new electrofocusing techniques. *Electrophoresis* **28,** 15–25 (2007).

147. Kim, S. M., Sommer, G. J., Burns, M. A. & Hasselbrink, E. F. Low-Power Concentration and Separation Using Temperature Gradient Focusing via Joule Heating. *Anal. Chem.* **78,** 8028–8035 (2006).

148. Ge, Z., Wang, W. & Yang, C. Rapid concentration of deoxyribonucleic acid via Joule heating induced temperature gradient focusing in poly-dimethylsiloxane microfluidic channel. *Anal. Chim. Acta* **858,** 91–97 (2015).

149. Balss, K. M., Ross, D., Begley, H. C., Olsen, K. G. & Tarlov, M. J. DNA hybridization assays using temperature gradient focusing and peptide nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 13474–13479 (2004).

150. Lin, H., Shackman, J. G. & Ross, D. Finite sample effect in temperature gradient focusing. *Lab. Chip* **8,** 969–978 (2008).

151. Ranchon, H. *et al.* DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids. *Lab Chip* **16,** 1243–1253 (2016).

152. Arca, M., Ladd, A. J. C. & Butler, J. E. Electro-hydrodynamic concentration of genomic length DNA. *Soft Matter* **12,** 6975–6984 (2016).

153. Dai, J., Ito, T., Sun, L. & Crooks, R. M. Electrokinetic trapping and concentration enrichment of DNA in a microfluidic channel. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 13026–13027 (2003).

154. Hahn, T., O'Sullivan, C. K. & Drese, K. S. Microsystem for Field-Amplified Electrokinetic Trapping Preconcentration of DNA at Poly(ethylene terephthalate) Membranes. *Anal. Chem.* **81,** 2904–2911 (2009).

155. Asbury, C. L. & van den Engh, G. Trapping of DNA in nonuniform oscillating electric fields. *Biophys. J.* **74,** 1024–1030 (1998).

156. Du, J.-R., Juang, Y.-J., Wu, J.-T. & Wei, H.-H. Long-range and superfast trapping of DNA molecules in an ac electrokinetic funnel. *Biomicrofluidics* **2,** 044103 (2008).

157. Cummings, E. B. & Singh, A. K. Dielectrophoresis in Microchips Containing Arrays of Insulating Posts: Theoretical and Experimental Results. *Anal. Chem.* **75,** 4724–4731 (2003).

158. Chou, C.-F. *et al.* Electrodeless dielectrophoresis of single- and double-stranded DNA. *Biophys. J.* **83,** 2170–2179 (2002).

159. Braun, D. & Libchaber, A. Trapping of DNA by thermophoretic depletion and convection. *Phys. Rev. Lett.* **89,** 188103 (2002).

160. Duhr, S. & Braun, D. Optothermal molecule trapping by opposing fluid flow with thermophoretic drift. *Phys. Rev. Lett.* **97,** 038103 (2006).

161. Khandurina, J., Jacobson, S. C., Waters, L. C., Foote, R. S. & Ramsey, J. M. Microfabricated Porous Membrane Structure for Sample Concentration and Electrophoretic Analysis. *Anal. Chem.* **71,** 1815–1819 (1999).

162. Dhopeshwarkar, R., Sun, L. & Crooks, R. M. Electrokinetic concentration enrichment within a microfluidic device using a hydrogel microplug. *Lab. Chip* **5,** 1148 (2005).

163. Kuo, C.-H., Wang, J.-H. & Lee, G.-B. A microfabricated CE chip for DNA pre-concentration and separation utilizing a normally closed valve. *Electrophoresis* **30,** 3228–3235 (2009).

164. Kuo, I.-T., Chiu, T.-C. & Chang, H.-T. On-column concentration and separation of double-stranded DNA by gradient capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **24,** 3339–3347 (2003).

165. Wanunu, M., Morrison, W., Rabin, Y., Grosberg, A. Y. & Meller, A. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. *Nat. Nanotechnol.* **5,** 160–165 (2010).

166. Paik, K.-H. *et al.* Control of DNA Capture by Nanofluidic Transistors. *ACS Nano* **6,** 6767–6775 (2012).

167. Park, S.-R. & Swerdlow, H. Concentration of DNA in a flowing stream for high-sensitivity capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **75,** 4467–4474 (2003).

168. Daghighi, Y. & Li, D. Numerical studies of electrokinetic control of DNA concentration in a closed-end microchannel. *Electrophoresis* **31,** 868–878 (2010).

169. Walker, G. M. & Beebe, D. J. An evaporation-based microfluidic sample concentration method. *Lab. Chip* **2,** 57–61 (2002).

Chapitre 2.

µLAS : un laboratoire sur puce pour l'analyse de l'ADN résiduel

Du principe physique au développement d'un système performant

Les systèmes commerciaux d'électrophorèse capillaire font figure de références pour l'analyse de l'ADN. Ils permettent la séparation des fragments en fonction de leurs tailles et leur détection. Toutefois, la sensibilité de ces systèmes est limitée pour l'analyse de l'ADN circulant dans le sang à faible concentration par exemple. Pour améliorer la sensibilité de détection, il est toujours possible de pré-concentrer l'échantillon avant séparation. La concentration peut être réalisée lors de la purification de l'échantillon ou lors de l'injection par des méthodes de stacking électrocinétique. Il est également possible d'amplifier le matériel présent dans un échantillon en réalisant une étape d'amplification PCR.

La technologie µLAS permet de réaliser ces opérations de concentration et de séparation de l'ADN simultanément. A partir du principe de concentration sélective de l'ADN, nous présenterons nos travaux pour le développement d'un système performant, dédié à l'analyse de l'ADN résiduel. Nous discuterons notamment des choix de design et de formulation du tampon qui ont été faits pour optimiser la sensibilité de détection, la résolution de la séparation et la vitesse d'analyse.

2.1. Principe de fonctionnement de µLAS

La concentration sélective d'espèces chargées en solution viscoélastique sous l'action opposée de forces hydrodynamique et électrique a été la première fois décrite pendant la thèse d'Hubert Ranchon avec Aurélien Bancaud, dont mes travaux sont la continuité. Cette invention a fait l'objet d'un brevet, publié en 2016 sous le titre « Procédé et dispositif de concentration de molécules ou objets dissous en solution » (WO 2016016470 A1). Deux innovations ressortent de cette invention : i) elle permet la séparation d'espèces chargées sans matrice solide, ii) elle permet de concentrer et séparer simultanément des espèces chargées. Nous avons rapidement identifié que ces caractéristiques pouvaient être mises à profit pour l'analyse de l'ADN, d'où le développement du système µLAS (micro Laboratoire pour la Séparation et l'Analyse de l'ADN).

2.1.1. Une première innovation : la séparation d'espèces chargées sans matrice solide

L'électrophorèse sur gel est la méthode historique de séparation d'espèces chargées en fonction de leur taille. En effet, il se trouve que la mobilité électrophorétique des espèces chargées ne dépend quasiment pas de la taille des molécules, rendant leur séparation impossible en solution libre.

2.1.1.1. De la difficulté de séparer de l'ADN sans matrice solide

2.1.1.1.1. Cas d'une particule chargée

Pour mieux comprendre ce phénomène, loin d'être intuitif (car une molécule plus grosse porte plus de charges susceptibles de répondre au champ électrique), il est possible de considérer l'exemple d'une particule de rayon R de charge de surface négative Q en suspension dans une solution ionique. Autour de la particule chargée, les ions de la solution se répartissent de manière à former une double couche électrique sur une longueur équivalente à la longueur de Debye λ_D (Figure 2.23). L'application d'un champ électrique exerce une force sur la particule et le nuage de contre-ions dans deux directions opposées. Plusieurs cas de figures existent, en fonction du rapport entre la taille de la particule et la longueur de Debye[1].

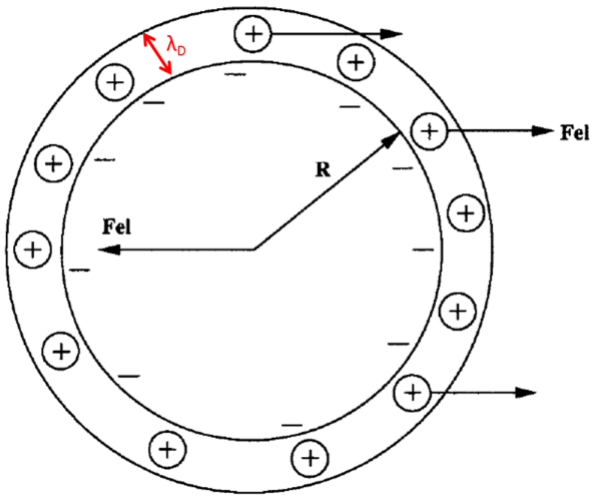


Figure 2.23. Réprésentation schématique d'une sphère de rayon R> λ_D chargée négativement. Sous l'application d'un champ électrique, une force F_{el} s'exerce sur la particule et sur le nuage de contre-ions dans des directions opposées. Adapté de Sartori et al.[2].

Dans le cas où R << λ_D, les contre-ions sont en interaction faible avec la particule. L'expression de la force électrique qui transmet sa vitesse à la particule est F_{el}= QE, avec Q la charge de la particule et E la valeur du champ électrique. Lorsque la particule entre en mouvement, une force de friction hydrodynamique, apparait dans la direction opposée au mouvement, suivant la loi de Stokes, et s'écrit F_S=6πηRv, avec v la vitesse de la particule et η la viscosité du fluide. En régime stationnaire, les forces s'équilibrent et on obtient une vitesse constante $v = \frac{QE}{6\pi\eta R}$ et une mobilité $\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi\eta R}$. La mobilité dépend alors de la taille de la particule.

Dans le cas où R >> λ_D, les ions aux voisinages de la surface forment une couche mobile et affectent le déplacement de la particule. La résolution de l'équation de Navier Stokes pour l'écoulement imposé par le champ électrique donne une mobilité $\mu = \frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{\eta}$, avec ζ le potentiel de surface de la particule. La mobilité ne dépend alors pas de la taille de la particule.

2.1.1.1.2. Cas de l'ADN

Le cas de l'ADN est un peu différent, on doit le considérer comme une macromolécule flexible. Il faut alors définir la longueur de persistance de la molécule L_P, qui correspond à la longueur

typique en dessous de laquelle le polymère est rigide. Pour de l'ADN, cette longueur correspond à environ 150 bp (~ 50 nm), et $L_P >> \lambda_D$ qui vaut typiquement quelques nanomètres en solvant ionique. On a alors trois cas possibles i) $L_P >> \lambda_D >>$ Rg, ii) Rg >> $L_P >> \lambda_D$, et iii) $L_P >> R_g >> \lambda_D$, avec R_g le rayon de giration de la molécule(c'est-à-dire le rayon moyen du cercle parcouru par la molécule d'ADN)[3]. La mobilité n'est dépendante de la taille de la chaîne que dans le cas où $L_P >> \lambda_D >>$ Rg et varie comme $\mu \sim \ln L_C$ avec L_C la longueur de contour de la molécule (qui représente la longueur totale entre les extrémités de la chaîne en conformation linéaire). Ainsi il est impossible de séparer des molécules courtes d'ADN en solutions libres au-delà de 400 bp environ, et des différences de mobilité sont observées pour des chaînes comprenant moins de deux monomères de 150 bp (Figure 2.24).

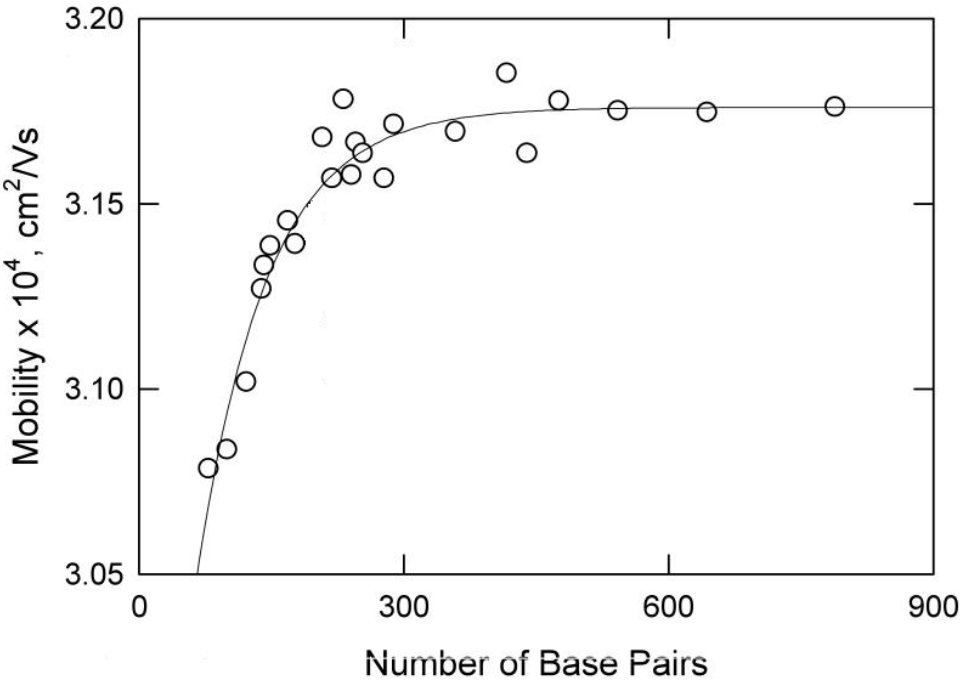


Figure 2.24. Représentation de la mobilité électrophorétique en fonction de la taille des molécules d'ADN dans une solution de TAE (Tris Acetate EDTA). Adapté de Stellwagen et al.[4].

Afin de mieux comprendre l'indépendance de la mobilité électrophorétique en fonction de la taille des chaînes, il est possible de modéliser la molécule d'ADN comme une chaîne fantôme constituée de N segments de Kuhn de longueur $2L_P$. La longueur de contour de la molécule est alors $L_C=2NL_P$. Sous l'action d'une force électrique, la vitesse de chaque segment est contrée par le mouvement opposé des contre-ions dans la couche de Debye (comme $L_p>>\lambda_D$, chaque segment à son nuage de contre ions). Le mouvement des contre-ions conduit à une décroissance rapide des interactions hydrodynamiques en électrophorèse, suivant $(\lambda_D/R)^3$, et les segments sont considérés indépendamment. La force électrique est alors F_{el} = NqE et la force de friction F_S = Nζ, avec q et ζ la

charge et le coefficient de friction de chaque segment, respectivement. En régime stationnaire, on obtient alors $v = \frac{qE}{\zeta}$ et une mobilité $\mu = \frac{q}{\zeta}$ indépendante de la taille de la molécule.

Dès lors, on comprend l'intérêt d'utiliser des matrices de gels ou de polymères enchevêtrés, ou des réseaux micro-fabriqués par gravure de substrats en verre ou en plastiques[5] pour support de séparation. Brièvement, la migration des molécules est forcée à travers des chemins préférentiels de la matrice en fonction de leurs tailles, permettant la séparation[1]. Toutefois l'utilisation de ces matrices solides présente quelques inconvénients. Par exemple, il arrive que les pores des matrices s'encrassent. De plus l'injection des gels ou des solutions de polymères dans des capillaires n'est pas toujours évidente et l'achat de consommables prêts à l'emploi représente un coût. Enfin les gammes de tailles de séparation dépend de la fabrication de la matrice est de la taille de ses pores. Ainsi la séparation de fragments d'ADN supérieurs à 50 kbp est le plus souvent réalisée par électrophorèse à champs pulsés et dure entre 4 et 72 heures[6].

Ainsi des stratégies alternatives à l'utilisation de matrices de séparation ont été développées. Une première stratégie consiste à modifier les molécules à séparer, grâce à la technique ELFSE (End-labelled free solution electrophoresis)[7]. Brièvement, cette technique consiste à greffer une molécule, appelée étiquette de friction (ou drag-tag), à l'extrémité des fragments d'ADN pour augmenter leur friction, de manière à ce que le rapport charge sur friction des complexes dépende de la taille des fragments. On peut citer les travaux de Heller et al, qui ont utilisé des molécules de streptavidine pour séparer un 100 bp ladder par électrophorèse capillaire en solution libre[8]. Toutefois cette méthode nécessite une certaine ingénierie des étiquettes de friction, la modification des molécules d'ADN, et la migration est relativement longue (plusieurs dizaines de minutes). Il est possible de consulter les revues de Won[9] et Meagher et al[10] pour plus d'informations sur cette technique.

Une seconde stratégie consiste à agir sur la vitesse d'écoulement des molécules dans un canal fluidique en modulant leur distribution dans la hauteur du canal.

2.1.1.2. De l'importance de la hauteur de l'ADN dans le canal

Dans un canal, l'écoulement suit un profil de Poiseuille. La vitesse de l'écoulement est maximale au centre de la canalisation et décroit jusqu'à être nulle aux bords de la canalisation, selon un profil parabolique. Ainsi, l'altitude des molécules dans le canal affecte leur vitesse de migration. Cet effet peut être mis à profit pour séparer des molécules. La modulation de la distribution des

molécules dans la hauteur du canal peut être induite, entre autre, par l'application d'une force transverse.

2.1.1.2.1. Chromatographie hydrodynamique et méthodes dérivées

La technique de séparation par chromatographie hydrodynamique se base sur la répulsion à la paroi des grosses molécules à cause de contraintes stériques. Ces dernières sont alors soumises à des vitesses d'écoulement plus importantes loin de la paroi[11,12]. Pour le bon fonctionnement de la méthode, le rapport entre la hauteur du canal et la taille des molécules à séparer est crucial. Cette technique a été adaptée à la séparation de molécules d'ADN dans plusieurs travaux, notamment en utilisant des capillaires confinés d'environ 5 µm de diamètre[13–17]. Wang et al, ont montré la séparation de brins d'ADN en 75 et 106000 bp en 150 minutes[14].

2.1.1.2.2. Méthode de fractionnement par couplage Flux-Force

La technique de fractionnement par couplage Flux-Force (FFF, pour Field-Flow Fractionation) est similaire à la chromatographie hydrodynamique, à la différence près qu'elle utilise une force externe, transverse à la direction de l'écoulement. Cette force transverse permet de plaquer les particules à séparer sur une des parois du canal, appelée paroi d'accumulation. Trois cas de figures peuvent alors survenir (Figure 2.25). Dans le mode normal, la diffusion s'oppose à la force de plaquage, et les petites particules capables de diffuser plus loin de la paroi migrent plus vite. Dans le mode stérique, les particules à séparer sont de plus grandes tailles et la diffusion négligeable. Les grosse particules ont leur centre plus éloigné de la paroi et migrent plus vite. Dans le mode hyperlayer, une force de lift opposée à la force transverse vient éloigner les particules de la paroi. Cette force est très mal comprise, mais son existence a été démontrée expérimentalement à plusieurs reprises. Williams a proposé une expression empirique de cette force pour des gammes de viscosité inférieures à 2 cP, à savoir $F = C\frac{a^3\mu\dot{\gamma}_w}{z-a}$ avec C une constante, $\dot{\gamma}_w$ le taux de cisaillement à la paroi, z la hauteur de la particule, et a le rayon de la particule[18,19]. Pour plus d'informations sur cette technique, il est possible de se référer à la revue de Messaud et al[20].

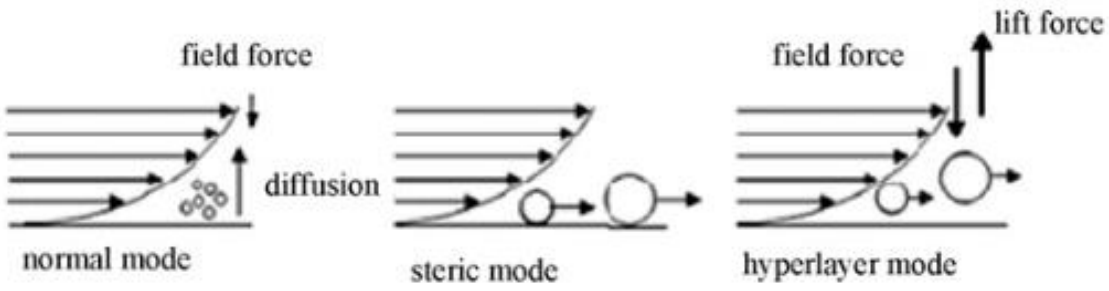


Figure 2.25. Représentation schématique des différents modes pouvant survenir lors d'une FFF. Tiré de Messaud et al.[20].

2.1.1.3. L'utilisation d'un fluide non Newtonien pour générer une force transverse à l'écoulement sous l'action de champs hydrodynamique et électrophorétique

La séparation d'ADN par la technologie µLAS repose elle aussi sur l'apparition d'une force transverse, résultante d'une actuation hydrodynamique et électrophorétique en solution viscoélastique. Pour comprendre l'origine de cette force et l'intérêt d'utiliser un fluide viscoélastique, nous allons d'abord montrer la différence dans le cas d'un fluide Newtonien.

2.1.1.3.1. Cas des fluides Newtoniens

Zheng et Yeung ont observé la migration radiale de molécules d'ADN phagique λ (~48 kbp) lors de l'application additionnelle d'un écoulement généré par un gradient de pression à l'électrophorèse dans un capillaire de 75 µm de diamètre[21]. Lorsque le flux hydrodynamique était appliqué dans la même direction que le flux électrophorétique, les molécules d'ADN migrent vers le centre du capillaire. Lorsque le flux hydrodynamique était appliqué dans la direction opposée au flux électrophorétique, les molécules d'ADN migrent vers les parois du capillaire.

Par ailleurs, les auteurs ont suggéré que cette technique pouvait être utilisée pour la séparation de l'ADN[22]. En effet, ces derniers ont remarqué que la vitesse de migration radiale des molécules était dépendante de leurs tailles. Cependant, une fois le régime permanent atteint, les positions d'équilibres sont indépendantes de la taille des molécules. Ainsi la séparation doit être réalisée en utilisant un champ hydrodynamique alternatif (Figure 2.26). Deux tailles de molécules (représentées par les points noirs et les cercles) sont transportées de façon homogène dans le canal par actionnement électrophorétique. L'application d'un flux hydrodynamique HDF dans la direction opposé au flux électrophorétique de manière à ce que les grosses molécules, plus déformables

migrent plus rapidement vers les parois où elles sont ralenties et une première séparation s'opère. Le sens de l'écoulement hydrodynamique est alors inversé, et les grosses molécules migrent plus rapidement vers le centre du capillaire où elles sont accélérées. En procédant ainsi, les auteurs ont séparé de l'ADN λ de 48,5 kbp et de l'ADN ΦX174 de 5,3 kbp en 20 minutes sur une distance de migration de 42 cm dans un capillaire de 75 µm de diamètre.

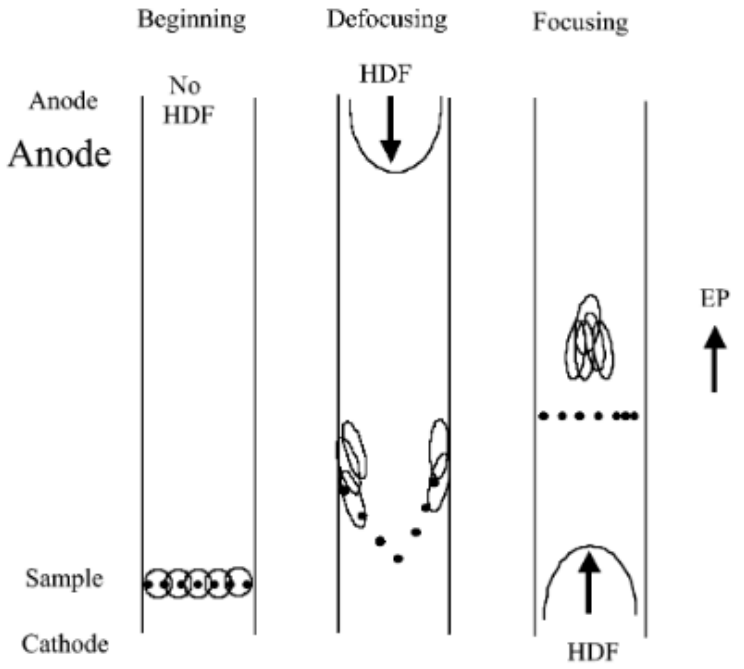


Figure 2.26. Représentation schématique de la séparation de molécules en fluide newtonien. Tiré de Zheng et Yeung[22]

Cette méthode, inapplicable en régime continu, apparaît trop laborieuse pour être utilisée en routine pour la séparation d'ADN.

2.1.1.3.2. Cas des fluides non Newtoniens

L'utilisation d'une solution viscoélastique permet de réaliser la séparation en régime continu. Les solutions viscoélastiques sont typiquement obtenues par dissolution de chaînes de polymère à haute fraction volumique. Un fluide viscoélastique peut être défini comme un fluide dont le comportement est intermédiaire entre celui d'un solide élastique et celui d'un liquide visqueux.

Sous l'application d'un écoulement hydrodynamique simple en solution viscoélastique, plusieurs études ont montré la focalisation de particules sphériques ou d'ADN vers le centre d'une canalisation[23]. Par exemple Leshansky et al. ont mis en évidence l'existence d'une force transverse de

migration s'exerçant sur une bille dans un capillaire de 20 µm de diamètre. Ils ont notamment montré que la migration latérale est orientée vers le centre du canal. Cette migration est dépendante de la taille de la bille et de la rhéologie de la solution[24]. De manière similaire, Del Giudice et al ont utilisé une solution de PVP (polyvinylpyrrolidone) pour aligner des particules au centre d'un canal[25]. Kim et al. ont appliqué ce principe à la focalisation d'ADN λ et d'ADN T4[26]. Il est intéressant de relever que des études ont remplacé les polymères synthétiques par des molécules d'ADN, à de très faibles concentrations (~0,0005 %, masse/volume), pour rendre des solutions viscoélastiques et focaliser des particules[27,28]. Pour plus d'informations sur la migration de particules en solution viscoélastiques, il est possible de consulter la revue de D'Avino et al.[29].

Toutefois, dans les études précédemment citées, les particules sont libres. Dans le cas où les particules sont fixées à une position par l'application d'une force additionnelle (comme la force électrophorétique dans nos travaux), les études expérimentales[30] et numériques[31] montrent plutôt une migration vers les parois du canal. Les travaux de Lee et al. tendent à confirmer ce phénomène[32]. Leur simulation numérique a indiqué la focalisation vers le centre pour une particule libre et la migration vers les bords pour une particule fixe. Par ailleurs, ils ont trouvé que dans le cas d'une particule fixe, la force transverse était bien plus grande que pour une particule libre. Pour conclure, l'addition d'une force opposée à l'écoulement accroit la force transverse et l'oriente en direction des parois du canal.

Les travaux de Lee et al, ont grandement inspiré le développement de la séparation par µLAS. Ainsi Hubert Ranchon et Aurélien Bancaud ont cherché à reproduire expérimentalement ces conclusions pour focaliser aux parois des particules chargées et de l'ADN, en utilisant une force électrophorétique pour contrer l'écoulement[33].

2.1.1.3.3. Expression de la force transverse pour un fluide non newtonien

Cette partie a seulement pour vocation de permettre au lecteur de mieux appréhender les facteurs qui ont une influence importante sur la force transverse, et donc sur le pouvoir de séparation. La modélisation physique du phénomène n'ayant pas été l'objet de cette thèse. Certains calculs récents pour arriver une expression de la force transverse ne seront pas détaillés. En effet, en reprenant les travaux d'Hubert Ranchon, Marius Socol et Bayan Chami (respectivement post-doctorant et doctorante dans l'équipe) se sont attachés à donner une expression de la force transverse, cohérente avec les résultats expérimentaux.

Un fluide viscoélastique peut être approximé par le modèle de Maxwell. Le modèle de Maxwell représente le fluide viscoélastique comme un amortisseur visqueux (de coefficient de viscosité η) mis en série avec un ressort linéaire (de module élastique E) (Figure 2.27).

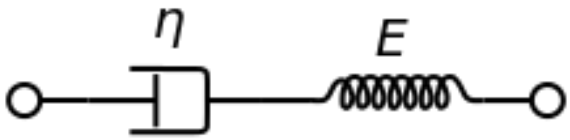


Figure 2.27. Représentation schématique du modèle de Maxwell.

- **Cas d'une contrainte uniaxiale :**

Dans un modèle à une dimension, lorsqu'une contrainte axiale est appliquée, il est possible de définir la contrainte totale σ_T et la déformation totale γ_T telle que : $\sigma_T = \sigma_A = \sigma_R$ et $\gamma_T = \gamma_A + \gamma_R$, où l'indice A désigne l'amortisseur et l'indice R le ressort. Les contraintes de l'amortisseur et du ressort sont $\sigma_A = \eta\dot{\gamma}_A$ et $\sigma_R = E\gamma_R$. Il est alors possible de relier l'évolution de la déformation avec celle de la contrainte au cours du temps.

On a alors le taux de cisaillement total du fluide $\dot{\gamma}_T = \dot{\gamma}_A + \dot{\gamma}_R = \frac{\sigma}{\eta} + \frac{\dot{\sigma}}{E}$. L'équation de Maxwell s'écrit $\eta\dot{\gamma}_T = \sigma + \tau\dot{\sigma}$ avec $\tau = \frac{\eta}{E}$ le temps de relaxation du fluide.

La solution générale de l'équation de Maxwell donne l'expression de la contrainte :

$$\sigma(t) = \frac{\eta}{\tau}\int_{-\infty}^{t} \exp(-\frac{t-t'}{\tau})\dot{\gamma}(t')dt' \qquad (1)$$

Cette expression montre que l'application d'une déformation à un liquide viscoélastique se traduit par une accumulation graduelle de contrainte selon un temps caractéristique déterminée par le temps τ.

- **Cas d'un écoulement de Poiseuille :**

Dans un modèle à trois dimensions, en utilisant la définition des axes représentés dans la figure 2.6, on considère une contrainte orientée suivant l'axe x, se traduisant par un écoulement de cisaillement $\dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dz}$. Le cisaillement du liquide viscoélastique est associé à une contrainte normale à l'écoulement $\sigma_{zz} = -2\eta\tau\dot{\gamma}^2$ et les autres composantes σ_{xx} et σ_{yy} sont nulles. On peut noter que lorsque

le fluide est purement visqueux, le temps de relaxation est nul et donc la contrainte transverse σ_{zz} est nulle également.

L'écriture des différences de contraintes normale donne $N_1 = \sigma_{xx} - \sigma_{zz} = 2\eta\tau\dot{\gamma}^2$ et $N_2 = \sigma_{yy} - \sigma_{zz} = 0$ pour un fluide de Maxwell. Dans un écoulement de cisaillement et pour un fluide visco-élastique, on a un excès de pression $N_1 = 2\eta\tau\dot{\gamma}^2$ dans la direction normale à l'écoulement.

L'écriture de la force transverse revient à écrire la différence entre les pressions exercées au-dessus et en dessous d'une bille de rayon a (Figure 2.28).

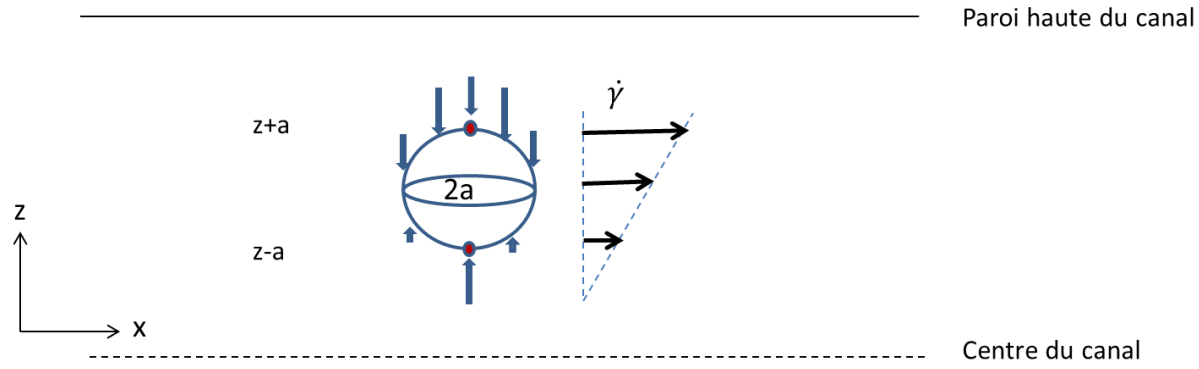


Figure 2.28. Représentation schématique d'une bille de rayon a dans un canal. Dans un écoulement de Poiseuille, le cisaillement du fluide génère une différence de pression entre le dessus et le dessous de la bille.

On a alors $F_T \sim (\pi a^2) \cdot (N_1(z+a) - N_1(z-a) \sim \pi a^3 \frac{\partial N_1}{\partial z}$

D'où

$$F_T \sim 2\pi\eta\tau a^3 \frac{\partial \dot{\gamma}(z)^2}{\partial z} \text{ avec } \dot{\gamma} \sim \frac{\partial v(x)}{\partial z} \qquad (2)$$

En conclusion, on obtient une force transverse **dépendante de la taille de la bille** et de la différence du taux de cisaillement. L'expression de la force dans un cisaillement simple (sans électrophorèse) montre que la bille est poussée vers le cisaillement le plus faible. Pour un écoulement de Poiseuille, le cisaillement est le plus faible au centre du canal (Figure 2.28). Par conséquent, la force transverse focalise la bille **vers le centre du canal**. Cette expression est souvent retrouvée dans la littérature sur les fluides viscoélastiques[32].

- **Effet de l'ajout d'une force électrophorétique sur la force transverse :**

Pour une bille dont le rayon très petit devant la hauteur du canal, il est possible de considérer que les lignes de champs sont très peu altérées autour de la bille (Figure 2.29).

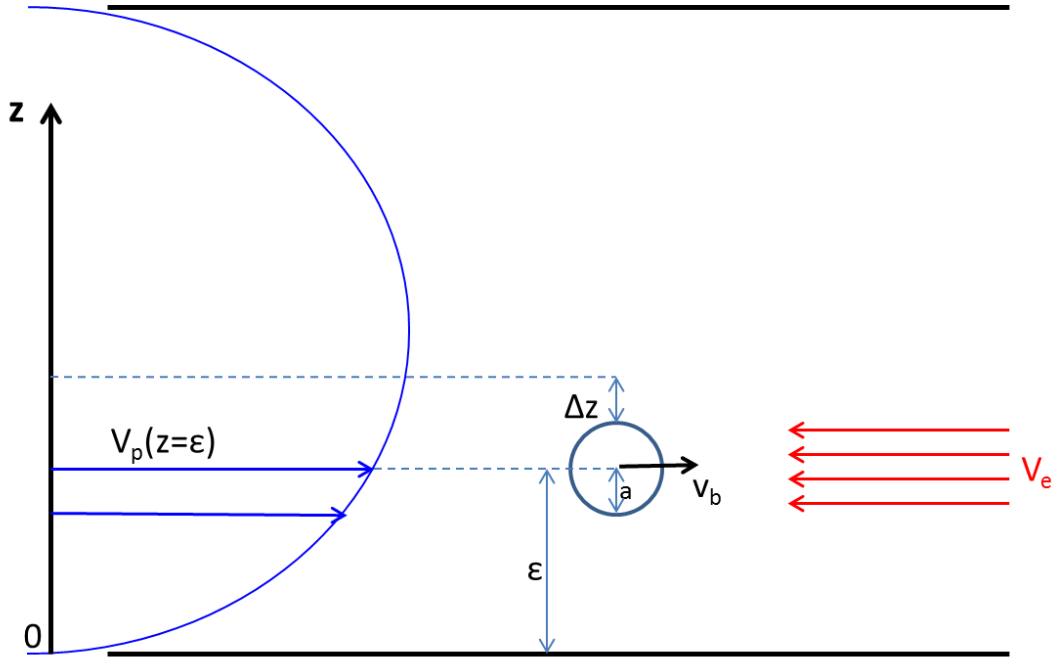


Figure 2.29. Bille soumise à une actuation hydrodynamique et électrophorétique. Avec V_p la vitesse en fonction de l'altitude de la bille et ε l'altitude de la bille.

Avec les notations de la Figure 2.29, la variation de vitesse au-dessus de la bille (pour une petite variation de hauteur Δz, choisie arbitrairement au voisinage de la bille) s'écrit : $\partial V \sim V_P(\varepsilon + a + \Delta z) - V_P(\varepsilon) + V_E$

et en dessous de la bille : $\partial V \sim V_P(\varepsilon) - V_P(\varepsilon - a - \Delta z) \pm V_E$

Sans présenter les calculs intermédiaires, en combinant l'expression de la variation de vitesse avec l'équation (2), l'expression de la force transverse est donnée par :

$$F_T^{el}(z) = -K \times 2\pi \times 2\eta\tau \times \pi a^2 \times \frac{2}{a}\frac{\partial V_{p(z)}}{\partial z}\left(2V_E + a^2\frac{\partial^2 V_P(z)}{\partial z^2}\right) \qquad (3)$$

Il faut noter que cette équation (3) est équivalente à l'équation (2) dans le cas où V_E est nul. Pour finir, en introduisant l'expression du champ de vitesse de Poiseuille, on obtient :

$$F_T^{el}(z) = -32K \times \eta\tau\pi a \times \frac{V_{max}}{h}\left\{V_e - 4V_{max}\frac{a^2}{h^2}\right\}\left\{1 - \frac{z}{h/2}\right\} \qquad (4)$$

On peut tirer les conclusions suivantes : (i) l'orientation de la force en présence ou en l'absence de champ électrophorétique est opposée et (ii) l'amplitude de la force est dominée par l'électrophorèse si le rapport a/h est petit. On peut donc simplifier l'expression (4) pour obtenir :

$$F_T^{el}(z) = -32K \times \eta\tau\pi a \times \frac{V_{max}V_e}{h}\left\{1 - \frac{z}{h/_2}\right\} \qquad (5)$$

Cette expression montre que la force transverse dépend linéairement du diamètre de l'objet d'intérêt. Autrement dit, pour de petites structures, l'amplitude de la force diminue moins fortement que l'effet de focalisation hydrodynamique (dépendance en a^3 dans la formule (2). Cette conclusion explique en partie pourquoi la séparation d'ADN de courte taille n'a pas été effectuée de manière convaincante sans champ électrique. On peut généraliser cet argument en disant que **l'ajout du champ électrophorétique permet d'augmenter l'amplitude de la force transverse** d'un facteur $\left(\frac{h}{a}\right)^2 \times \frac{V_E}{V_{max}}$.

Pour plus de détails sur la hauteur de la bille dans le canal, nous invitons de lecteur à consulter les expériences de tracking menées par Hubert Ranchon, et qui ont été publié dans un papier dont nous sommes co-auteurs[33], et disponible en annexes de ce manuscrit.

2.1.1.4. La séparation par µLAS

A ce stade de notre étude, nous tenons à rappeler au lecteur que nous avons montré :

- Que la position radiale des molécules dans le canal permet leur séparation dans un écoulement de Poiseuille.
- Qu'une force transverse significative, en direction des parois du canal, dépendante de la taille des molécules, peut être générée sous l'action d'une force opposée à l'écoulement dans une solution viscoélastique.

A partir de ces conclusions, la séparation en taille de l'ADN par µLAS se déroule comme décrit dans la Figure 2.30. Différentes tailles de fragments d'ADN sont introduits dans le réservoir d'un canal microfluidique préalablement rempli d'une solution viscoélastique. L'application d'un actionnement hydrodynamique force l'écoulement des molécules dans le canal. Selon le phénomène décrit dans la partie précédente, on a alors un effet de focalisation des molécules au centre de la canalisation, négligeable en termes de séparation (Figure 2.30A). L'application additionnelle d'un

champ électrique dans la direction opposée à l'écoulement, accentue la force transverse et change son sens vers les parois du canal. La valeur de la force transverse dépend de la taille des molécules, qui migrent alors à des hauteurs différentes (Figure 2.30B). Si les forces hydrodynamiques l'emportent sur les forces électrophorétiques, l'ADN continue sa migration dans le canal en étant simplement ralenti. La vitesse de migration dépend alors de la hauteur de la molécule, et donc de sa taille, et une séparation s'opère au cours du temps (Figure 2.30C).

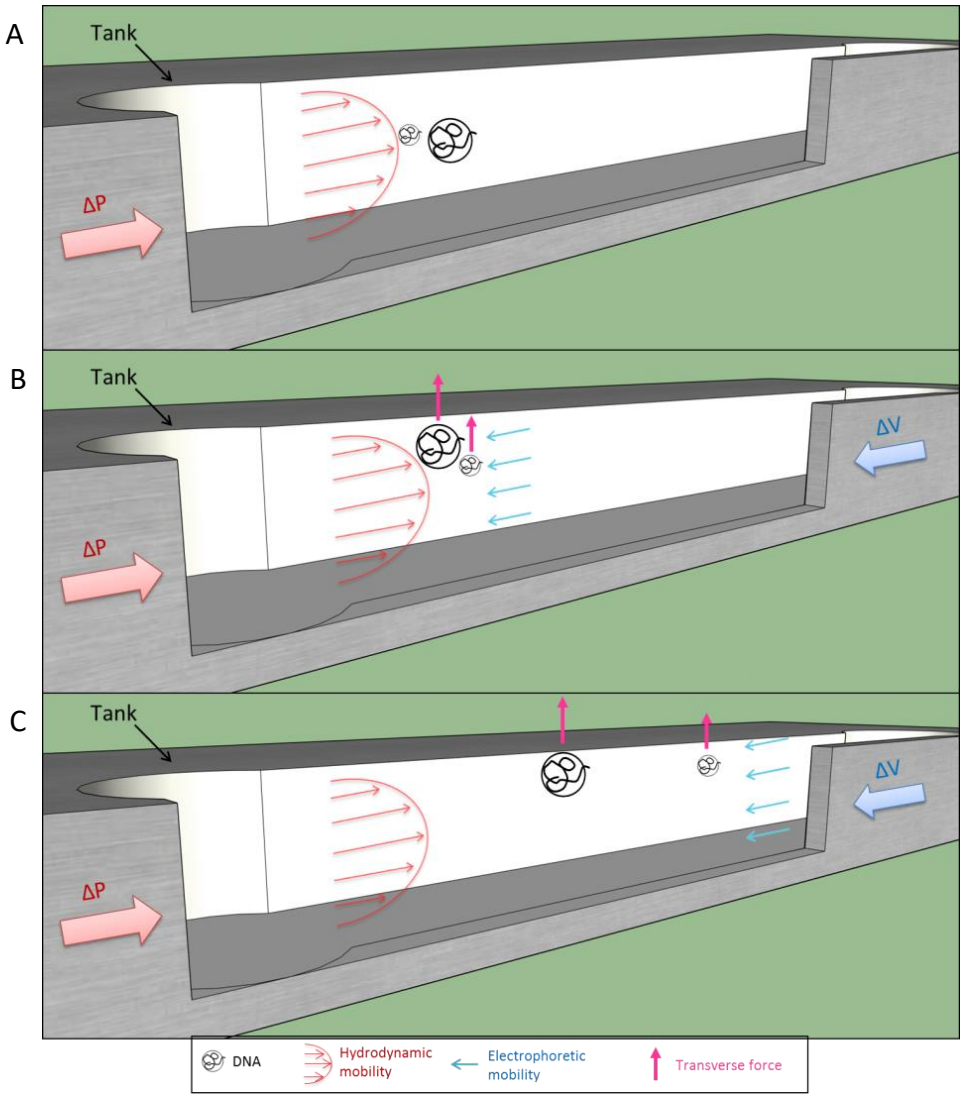


Figure 2.30. Représentation schématique des étapes de la séparation par µLAS dans une coupe de canal microfluidique. A) Un actionnement hydrodynamique focalise l'ADN au centre du canal. B) L'ajout d'un actionnement électrophorétique opposé génère une force transverse dépendante de la taille de la molécule. C) L'ADN migre à des vitesses différentes en fonction de sa hauteur dans le canal.

Ainsi dans cette partie nous avons présenté une première innovation permettant la séparation en taille de l'ADN sans matrice solide.

2.1.2. Une seconde innovation : la concentration et la séparation simultanées de l'ADN

Au-delà de la séparation de l'ADN, une fonction de concentration contribue à la sensibilité des systèmes d'analyse. Dans le premier chapitre, nous avons vu qu'un gradient de champ peut être utilisé pour focaliser des molécules à une position donnée du canal. Suivant ce principe, nous avons émis le raisonnement que la focalisation peut être réalisée en modulant l'intensité de la force transverse dans le canal. La force transverse étant dépendante des vitesses hydrodynamiques et électrophorétiques, nous avons introduit une constriction dans notre canal microfluidique (Figure 2.31) de manière à moduler spatialement ces vitesses. En effet, les lois de conservation du débit et du champ électrique imposent que la variation des vitesses soit inversement proportionnelle à la largeur du canal (Figure 2.31C).

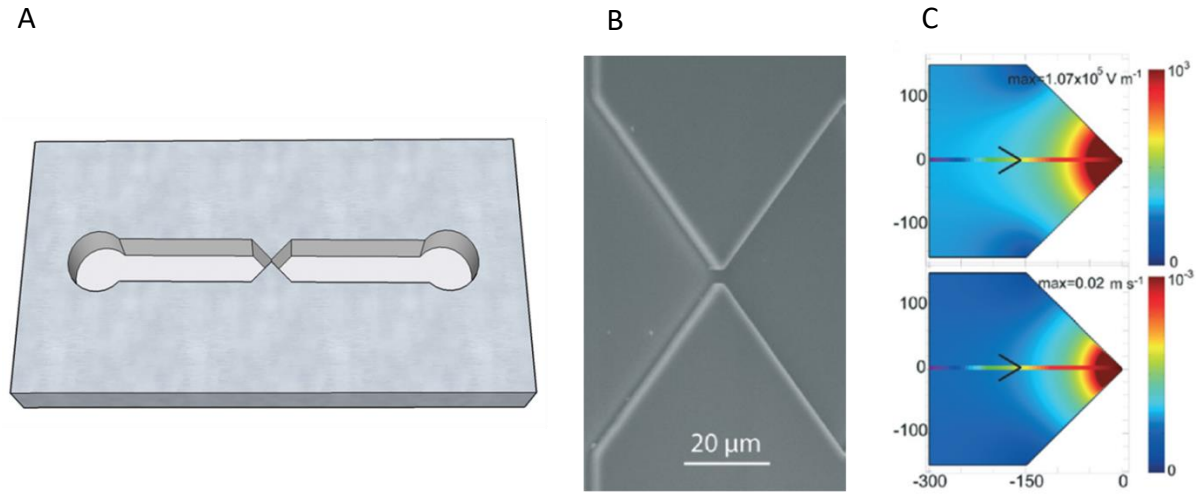


Figure 2.31. Exemple d'une double constriction symétrique au centre d'un canal microdluidique. A) Représentation schématique. B) Image de microscopie électronique d'une constriction. C) Modélisation de l'amplitude du champ électrique et hydrodynamique par éléments finis[33].

La focalisation se déroule comme décrit par la Figure 2.23 pour une taille de molécule et des paramètres de pression et de voltage donnés. Lorsque la constriction est large, la force transverse est faible. Les molécules sont à une hauteur où la migration est dominée par l'hydrodynamique et elles sont transportés en avant (v_h>µE, à gauche de la Figure 2.32). Lorsque la constriction est étroite, la force transverse est forte. Les molécules sont à une hauteur où la migration est dominée par le champ électrique et elles sont ramenées en arrière (v_h<µE, à gauche de la Figure 2.32). Ainsi au niveau de la constriction, il existe une unique position d'arrêt où la vitesse électrophorétique

compense la vitesse hydrodynamique, permettant la focalisation de l'ADN (v_h=µE, au centre de la Figure 2.32).

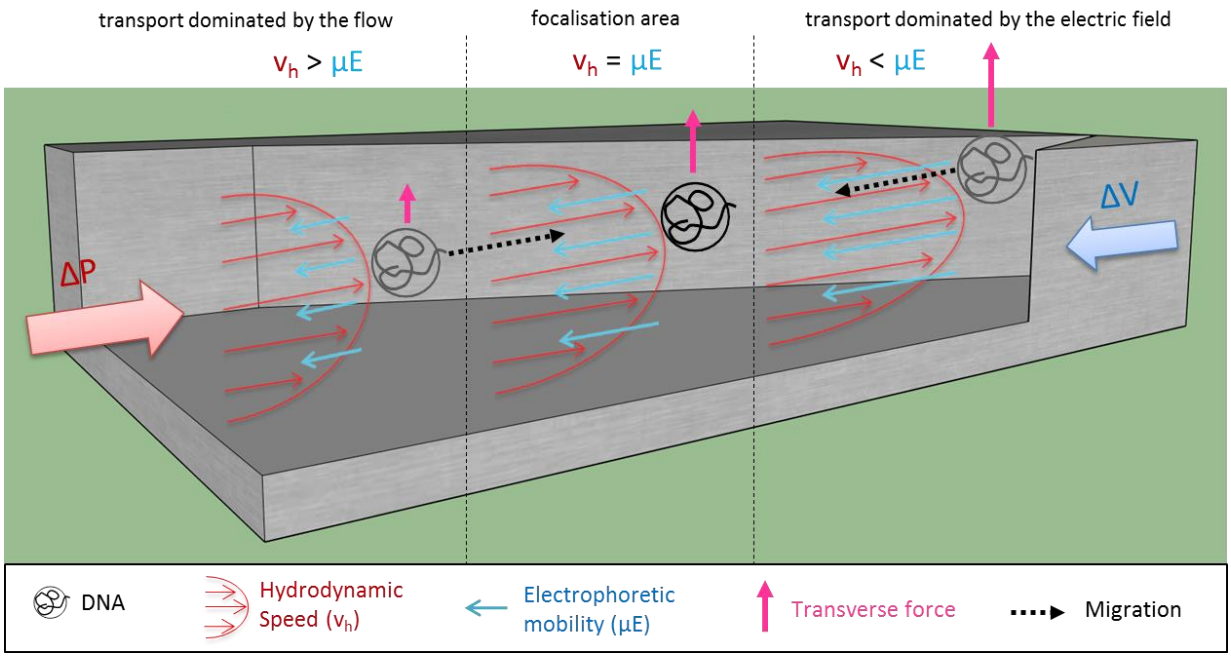


Figure 2.32. Représentation schématique de la concentration de l'ADN par modulation de la force transverse. Vue de côté d'une coupe de canal microfluidique au niveau de la constriction.

Le principe de concentration sélective se déroule comme décrit par la Figure 2.33. Au niveau de la constriction, pour une taille de molécule et des paramètres de pression et de voltage donnés, il existe une position où la vitesse électrophorétique compense la vitesse hydrodynamique (à gauche de la Figure 2.33). Toutefois, à cette position, une molécule plus petite, moins haute dans le canal (car soumise à une force transverse moindre), a sa vitesse dominée par l'hydrodynamique, et continue sa migration (au centre de la Figure 2.33). En migrant vers la partie la plus étroite de la constriction, cette petite molécule est soumise à des champs de vitesses plus importants. Conséquemment, la force transverse qui s'exerce sur elle devient suffisante pour la maintenir à une hauteur où les vitesses se compensent, forçant son arrêt (à droite de la Figure 2.33). Avec l'écoulement qui maintient un apport continu de matériel, l'ADN est concentré sélectivement en fonction de sa taille.

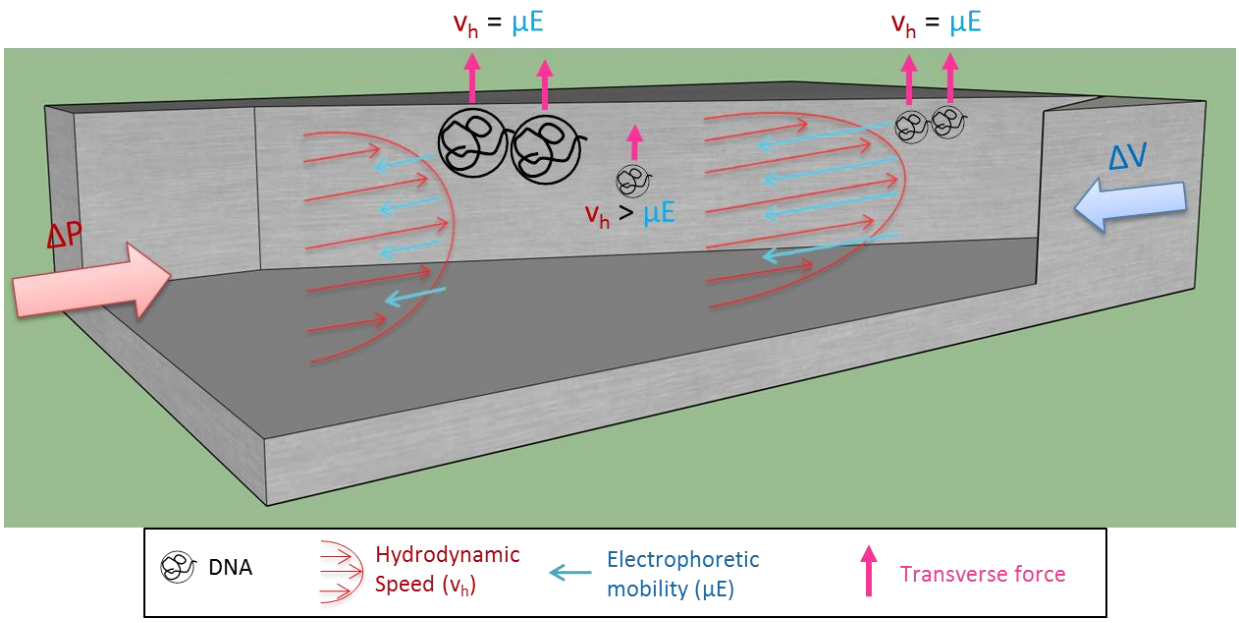


Figure 2.33. Représentation schématique d'une coupe de canal au niveau de la constriction. La variation des gradients de vitesses permet de concentrer sélectivement les molécules d'ADN.

La plupart des systèmes d'analyse de l'ADN combinent des opérations séquentielles de concentration, puis de séparation de l'ADN. La seconde innovation de µLAS consiste à réaliser ces opérations simultanément. Ainsi la détection est facilitée, sans augmenter le temps d'analyse.

2.1.3. Présentation de la concentration sélective d'un 100 bp ladder

A présent que le principe de fonctionnement de µLAS a été présenté, nous pouvons l'illustrer par le résultat expérimental d'une concentration sélective de fragments d'ADN. A ce stade, nous ne nous attarderons pas sur les détails expérimentaux, qui seront donnés dans la partie 2.2.1 de ce chapitre. Par ailleurs, ce descriptif peut être retrouvé dans la publication de Ranchon et al. en annexe[33].

Brièvement, l'échantillon d'ADN est un marqueur de taille commercial composé de fragments compris entre 100 et 1500 paires de bases (100 bp ladder). L'ADN est dilué dans un tampon rendu viscoélastique par l'introduction de polyvinylpirrolidone (PVP), marqué en fluorescence par un intercalant (YOYO-1) pour l'observation microscopique, et introduit dans un canal microfluidique. Notons que d'autres polymères, tel que le polyéthylène glycol (PEG), bien que moins utilisés et caractérisés dans nos travaux, peuvent convenir pour le tampon de séparation moyennant l'ajustement des paramètres d'actuations.

La manipulation se déroule comme suit. L'écoulement est généré par l'application d'une pression externe (Figure 2.34, 0 sec). Après trois secondes, un champ électrique est appliqué en opposition au sens de l'écoulement. La séparation en taille de l'ADN est très rapide et les fragments sont regroupés sous forme de bandes (Figure 2.34, 15 sec). L'intensité des bandes augmente au cours du temps, du fait de la concentration des molécules amenées en continu par l'écoulement (Figure 2.34, 45 sec). Pour l'expérience présentée, les paramètres expérimentaux permettent la résolution de trois bandes. Les autres tailles sont mélangées à l'extrémité de la constriction ou ne sont pas arrêtées. La différence d'intensité entre les bandes s'explique par les différences de vitesses de migration des molécules en fonction de leur hauteur dans le canal. Ainsi les petites tailles de fragments ont des facteurs d'enrichissement plus élevés.

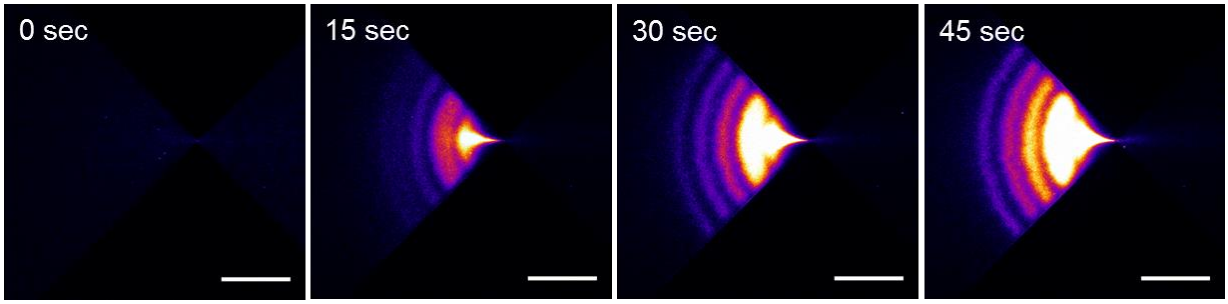


Figure 2.34. Série de micrographes présentant la concentration sélective de l'ADN dans un canal muni d'une constriction au cours du temps. Les paramètres sont 2 bars et 33 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 11,4 cm/s et un champ électrique de 2145 kV/m à la constriction. Le tampon contient du PVP à 5%. L'échelle correspond à 100 µm.

2.2. Développement et optimisation de µLAS pour l'analyse de l'ADN

Dans la partie précédente, nous avons décrit le principe de concentration sélective de l'ADN. Dans cette partie nous allons d'abord présenter le montage expérimental de µLAS. Dans un second temps nous décrirons les choix qui ont été faits lors du développement du système µLAS, et nous discuterons de leur pertinence vis-à-vis des applications et des performances visées.

2.2.1. Description du montage et de l'expérience de séparation par µLAS

La séparation par µLAS se déroule selon le protocole suivant. Toutes les solutions sont filtrées à 0,22 µm avant introduction dans la puce.

Le tampon viscoélastique est préparé par dilution de PVP 1,3 MDa, entre 2% - 5% en concentration (Sigma Aldrich) dans une solution de TBE 1x (Tris-Borate-EDTA) (Figure 2.35). Pour le marquage de l'ADN, un intercalant fluorescent, par exemple YOPRO-1 ou YOYO-1 (Thermo Fischer) sont généralement utilisés à une concentration ajustée par rapport à la concentration en ADN pour optimiser le signal (généralement le YOPRO-1 est utilisé à 100 nM et le YOYO-1 est ajusté de manière à avoir un ratio d'1 molécule fluorescente pour 4 bp d'ADN). Un agent réducteur, le DTT (Dithiothréitol, Sigma Aldrich) est régulièrement dilué dans le tampon à une concentration de 2% en masse pour stabiliser les fragments d'ADN et limiter le photo-blanchiment du marquage. L'échantillon d'ADN est dilué dans le tampon viscoélastique, idéalement pour avoir une concentration finale d'environ 0,1 ng/mL/taille de fragment (au-delà, la concentration sature la détection rapidement).

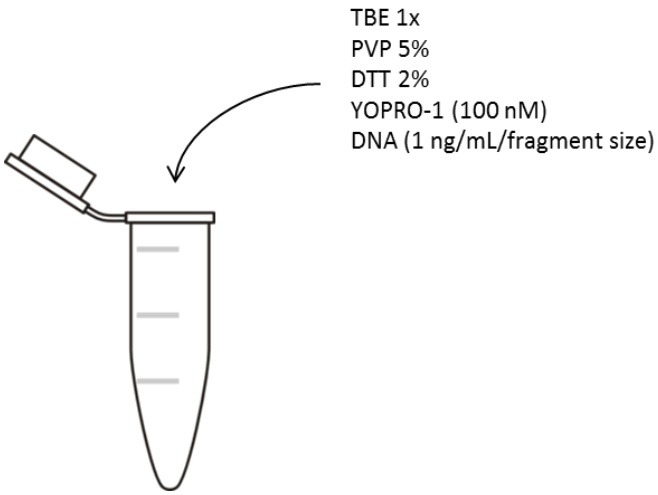


Figure 2.35. Préparation de l'échantillon pour la séparation.

La puce microfluidique est encapsulée dans un support en PEEK (PolyEtherEtherKetone) de manière à ajouter des réservoirs dans lesquels sont intégrées des électrodes de platine (Figure 2.39).

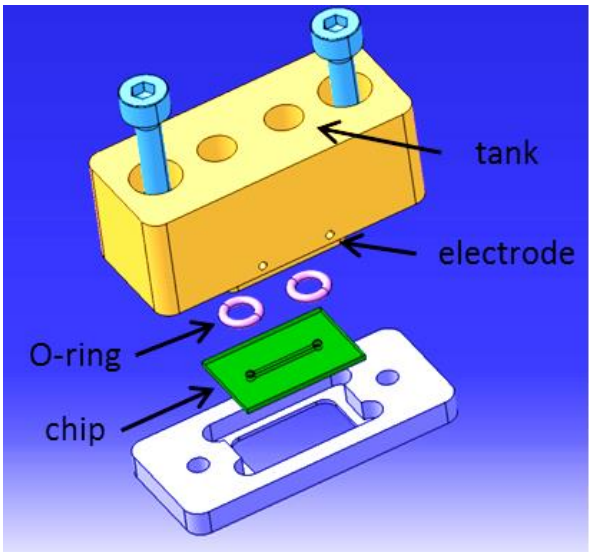


Figure 2.36. Représentation schématique de l'intégration de la puce microfluidique dans son support.

Le support est ensuite placé sous un microscope à épifluorescence Zeiss muni d'une caméra EMCCD (Electron Mutiplying Charge Coupled Device) (Andor Zyla) et d'une source de lumière Lumencore Light Engine. La prise d'images et de vidéos est réalisée à l'aide du logiciel open source Micro-Manager. La pression est générée par couplage d'un contrôleur de pression (Fluigent MFCS 7 bars, contrôlé avec le logiciel constructeur) directement dans le support à l'aide de connectiques

pneumatiques (Legris, ref: 3171 04 20). La tension est appliquée par un générateur de tension DC directement connecté aux électrodes (Figure 2.37).

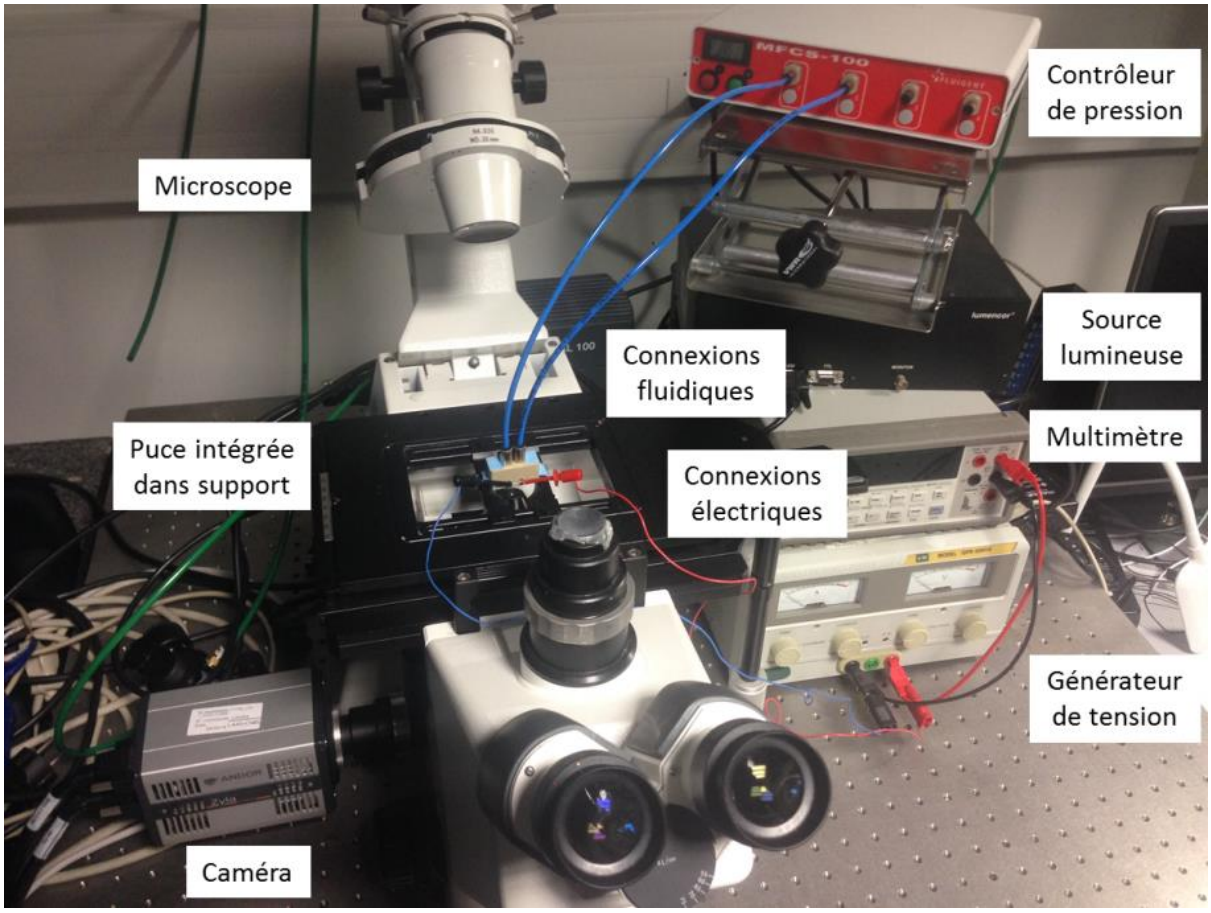


Figure 2.37. Présentation du montage expérimental.

Le canal microfluidique est préalablement rempli d'une solution d'éthanol pur pour limiter les bulles et nettoyer le canal. L'éthanol est ensuite lavé avec un tampon TBE 1x, PVP. Enfin l'échantillon est injecté dans les réservoirs pour la séparation.

2.2.2. Le design de la puce microfluidique

Au cours de ces trois années de thèse, de nombreux designs de canaux ont été testés principalement dans le but d'améliorer les séparations en fonction des tailles ciblées et augmenter les débits. Si toutes les géométries de canal et de constriction n'ont pas été systématiquement comparées, l'observation et la pratique ont souvent guidé les développements successifs.

2.2.2.1. Le choix du matériau

Les puces microfluidiques utilisées pour µLAS sont composées de deux parties. La première est le substrat qui sert de support au canal microfluidique. La seconde partie est une lamelle de verre de 170 µm d'épaisseur, qui sert à encapsuler les canaux et permettre l'observation microscopique. Pour le choix du matériau du substrat, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Le canal doit pouvoir résister aux fortes pressions (>1 bar) utilisées pour générer l'écoulement sans trop se déformer. En fonction du substrat, la technique de scellement avec le capot de verre peut varier, mais elle doit également résister aux pressions utilisées. De plus, pour permettre l'application d'un champ électrique, le canal doit également être isolé électriquement. Enfin le matériau doit permettre la fabrication contrôlée des canaux avec des dimensions reproductibles.

Plusieurs options ont été testées. Pendant sa thèse Hubert Ranchon a commencé à travailler avec des substrats en PDMS (polydimethylsiloxane). Le PDMS est un polymère communément répandu pour la fabrication de puce en silicone[34]. Il a l'avantage d'être biocompatible et peu couteux. Toutefois, au fil des développements, ce matériau s'est révélé trop déformables aux pressions utilisées pour le fonctionnement de µLAS (>1 bar). Pour gagner en reproductibilité et en robustesse, nous nous sommes tournés vers des substrats en silicium. Les techniques de micro-fabrication sur substrat de type silicium sont très matures car elles bénéficient des développements mis en place pour la microélectronique (Le protocole complet de fabrication des puces microfluidiques peut être retrouvé en annexe). La gravure du silicium permet d'obtenir des canaux reproductibles avec des résolutions de l'ordre du micromètre, parfaitement adaptées à la constriction. Pour permettre l'application d'un champ électrique dans le canal, le silicium semi-conducteur est isolé par croissance d'une couche d'oxyde (SiO_2). Le silicium présente l'avantage de ne pas se déformer sous des pressions élevées, et l'encapsulation par soudure anodique permet d'avoir un collage résistant. Enfin le silicium est connu pour ses excellentes propriétés de dissipation thermique, ce qui limite l'échauffement du système lors de l'électrophorèse. Pour toutes ces raisons, le substrat en silicium a été retenu pour le développement de notre dispositif.

Cependant, il nous semble important de relever que la couche d'oxyde permet d'isoler le silicium jusqu'à une valeur de tension de claquage de l'ordre de 0.5 V/nm[35]. Au-delà de cette tension de claquage, des arcs électriques se forment et le courant passe préférentiellement dans le silicium plutôt que dans la solution d'électrophorèse. L'épaisseur de la couche d'oxyde est quant à elle limitée par le procédé de croissance (jusqu'à 2 µm d'épaisseur) et surtout par l'étape de soudure

anodique, limitée par l'isolation de la surface. Pour éviter d'être limité en tension électrique, nous avons testé l'utilisation de substrats en verre. Toutefois nous n'avons pas obtenus de canaux suffisamment lisses à la gravure, et cette option a été abandonnée pour le moment.

2.2.2.2. Les dimensions du canal

Au cours de cette thèse, plusieurs générations de puces ont été utilisées. Pour chaque dimension, les changements successifs ont été guidés par nos observations et nos réflexions.

2.2.2.2.1. La hauteur du canal

La hauteur du canal est importante pour le confinement des molécules. Selon le modèle de Flory, le rayon de giration d'une molécule d'ADN s'écrit $R_g \sim L_c^{3/5}$. Ainsi nous travaillons généralement avec des molécules dont le diamètre varie entre 8 nm (pour du 100 bp) et 42 nm (pour du 1500 bp). La hauteur du canal être suffisamment grande pour que la molécule ne moyenne pas les lignes de champ de vitesse, si on veut pouvoir séparer les espèces. Par ailleurs, plus la hauteur du canal est faible, et plus la résistance hydrodynamique est grande, nécessitant d'appliquer de très fortes pression pour actionner l'écoulement. Pour nos expériences, des hauteurs de canal trop importantes sont problématiques pour la détection sensible de l'ADN en fluorescence. En effet, nous utilisons régulièrement des intercalants fluorescents dissous directement en solution. Ainsi plus le canal est haut et plus on a de bruit de fond. Pour la séparation, nous avons utilisé des canaux dont la hauteur variait entre 0,5 µm et 6 µm (Figure 2.38).

Pour améliorer la vitesse d'acheminement des espèces vers la constriction où se déroule la séparation, nous avons tenté de minimiser la résistance hydrodynamique en gravant une portion de canal plus profondément. Ainsi, autour de la constriction, la hauteur du canal de nos puces valait approximativement 15 µm.

2.2.2.2.2. La largeur et la longueur du canal

Pour nos expériences, nous avons utilisé des canaux d'1 cm de long. Cette dimension est peu importante pour la séparation. Elle sert à éviter d'injecter directement l'échantillon au niveau de la

constriction et d'avoir un écoulement symétrique le long de la section transverse à distance du coude formé par le réservoir. Pour des raisons pratiques, les réservoirs aux extrémités du canal doivent être suffisamment éloignés pour pouvoir visser les connecteurs fluidiques.

En ce qui concerne la largeur du canal, il est intéressant d'avoir des canaux larges pour négliger les effets de bords générés au niveau des parois latérales du canal. Ainsi, une largeur de canal très supérieure à sa hauteur permet de considérer l'écoulement comme un écoulement entre deux plaques infiniment larges. Toutefois pour des largeurs de canal trop importantes, le risque d'effondrement du canal lors de sa fabrication augmente. Ainsi nous avons travaillé avec les largeurs de canaux entre 800 et 1000 µm.

En ce qui concerne la largeur de la constriction, une constriction étroite permet d'améliorer le confinement et l'accélération des lignes de champs de vitesse pour une meilleure résolution de séparation. Toutefois, le choix de la taille de la constriction est un compromis, elle ne doit pas être trop faible pour ne pas trop limiter le débit (la résistance hydrodynamique étant la plus forte à cet endroit). De plus, d'un point de vue pratique, une constriction étroite augmente le risque de bouchage du canal par des poussières ou des cristaux de sels. Ainsi nous avons utilisé des largeurs de constriction entre 2 µm et 20 µm. Avec ces largeurs de canal, le facteur d'accélération du débit s'élève jusqu'à 500 dans nos puces (Figure 2.38).

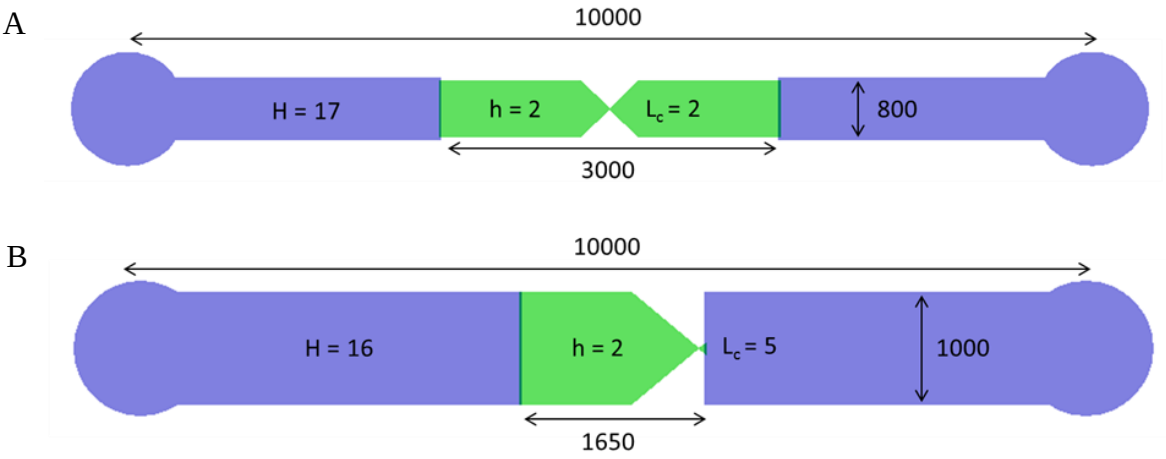


Figure 2.38. Exemples de design de puces utilisées pour nos expériences. Entre la première génération (A) et la dernière (B), plusieurs modifications ont été apportées : le canal et la constriction ont été élargis, la constriction n'est plus symétrique et a été raccourcie pour augmenter les débits. L'unité des dimensions est le micromètre.

Le choix des dimensions est un compromis. La constriction permet d'induire une accélération de l'écoulement et donc de balayer une plage de vitesse d'écoulement. Mais, les résistances hydrodynamique et électrophorétique sont maximales au niveau de la constriction si bien que le

débit d'écoulement est ralenti par rapport à un canal droit. Avec la viscosité de la solution et les paramètres d'actionnement, les dimensions du canal influencent le débit.

A ce stade de notre étude il est intéressant de préciser que le débit est un paramètre limitant pour nos expériences sur l'ADN circulant dans le sang. Pour la détection optique, une centaine de molécules cibles sont généralement nécessaires. Ces molécules étant très diluées, le débit doit être suffisant pour analyser un volume d'échantillon conséquent dans des délais raisonnables. Par exemple, si l'on reprend le cas pratique présenté dans le chapitre 1. Pour un patient à un stade précoce du cancer, dont la charge en ctDNA est de 1 ng/mL de sang, on a ~600 copies cibles par millilitre de sang. En considérant que l'extraction de l'ADN permet de gagner un facteur 10 en concentration et la dilution par 2 dans notre tampon de séparation, il faut être capable de traiter environ 30 µL d'échantillon. L'expression du débit est différente pour chaque génération de puce. Par exemple pour le design de canal de la Figure 2.38B, le débit est donné par $Q = \frac{\Delta P}{\eta}$. Pour un tampon de viscosité de 35 cP (PVP 5%), et une différence de pression de 7 bars, le débit est de 0,2 µL/min. Avec une concentration en PVP de 2% (6 cP), le débit passe à 1,2 µL/min. Par conséquent nous garderons à l'esprit cette problématique lors du dimensionnement des canaux pour la détection de ctDNA. Notons toutefois que nous avons commencé à développer des canaux à hauteur variable (ou canaux en pente, obtenus par gravure d'un gradient de profondeur), pour s'affranchir de la constriction et gagner en débit.

2.2.2.3. La géométrie de la constriction

Plusieurs géométries ont également été testées pour la constriction. Les profils linéaires de constriction permettent d'obtenir une répartition relativement équidistantes des bandes d'un ladder 100 bp (Figure 2.39), quel que soit l'angle de la pente. En revanche, cette forme ne permet pas de séparer des petits fragments (<200 bp). Nous attribuons cet effet au fait que l'arrêt de molécules de bas poids moléculaires nécessite de très forts champs de vitesse. Par conséquent, l'arrêt survient dans un petit espace à l'embouchure de la constriction, provoquant le mélange des bandes (Figure 2.39). Pour séparer les tailles de bas poids moléculaires avec un profil linéaire, un utilisateur pourrait être tenté d'augmenter le champ électrique ou de baisser la pression pour déplacer les bandes vers une région mieux résolue. Cependant dans ce régime, la force transverse ne nous est pas apparue suffisante pour arrêter ces petits objets.

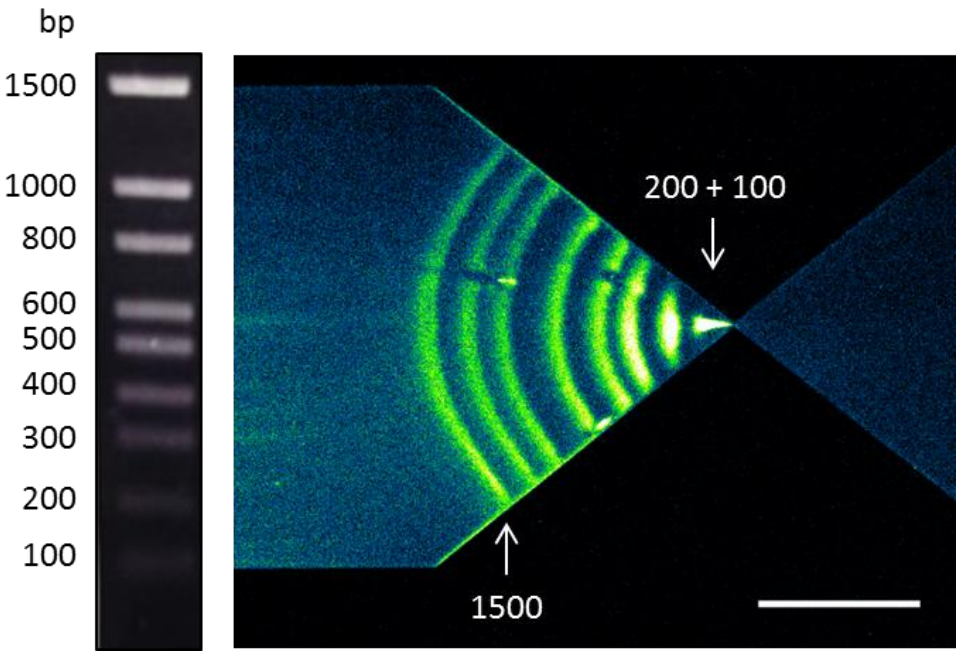


Figure 2.39. Séparation d'un 100 bp ladder commercial (dont la séparation sur gel d'agarose est présentée à gauche) par µLAS. Les fragments de 100 et 200 paires de bases sont mélangés à l'embouchure de la constriction. Les paramètres sont 6 bars et 82 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 7,1 cm/s et un champ électrique de 6888 kV/m à la constriction. Le tampon contient du PVP à 5%. L'échelle correspond à 300 µm.

Pour améliorer la séparation des ADN de bas poids moléculaires, nous avons imaginé des constrictions de pentes non linéaires. Pour des paramètres opératoires identiques, nous avons comparé les séparations du 100 bp ladder entre une constriction de pente en $y = ax^3$ et $y = ax$ (Figure 2.40). La résolution entre deux bandes est donnée par l'expression $R = \frac{D(B_1,B_2)}{L(B_1)+L(B_2)}$, avec $D(B_1,B_2)$ la distance entre le centre des bandes B_1 et B_2 and L leurs largeurs. Pour les bandes de haut poids moléculaires, on obtient des résolutions sensiblement égales (R = 0,67 entre les bandes de 1000 et 800 bp pour les deux géométries, car si la distance entre les bandes augmente, elles sont plus larges pour la géométrie linéaire). En revanche, pour les bandes de bas poids moléculaire, la géométrie en $y = ax^3$ permet la séparation des bandes <200 bp. Avec ce profil en $y = ax^3$, dans la partie large de la constriction, la variation des vitesses et de la force transverse est importante, résultant dans des bandes fines mais peu séparées. Dans la partie étroite de la constriction, la variation des vitesses et de la force transverse est très douce, résultant dans des bandes plus larges et plus espacées. Ainsi, il est possible d'ajuster la géométrie de la constriction en fonction des tailles de fragments à analyser et du profil de bandes recherché.

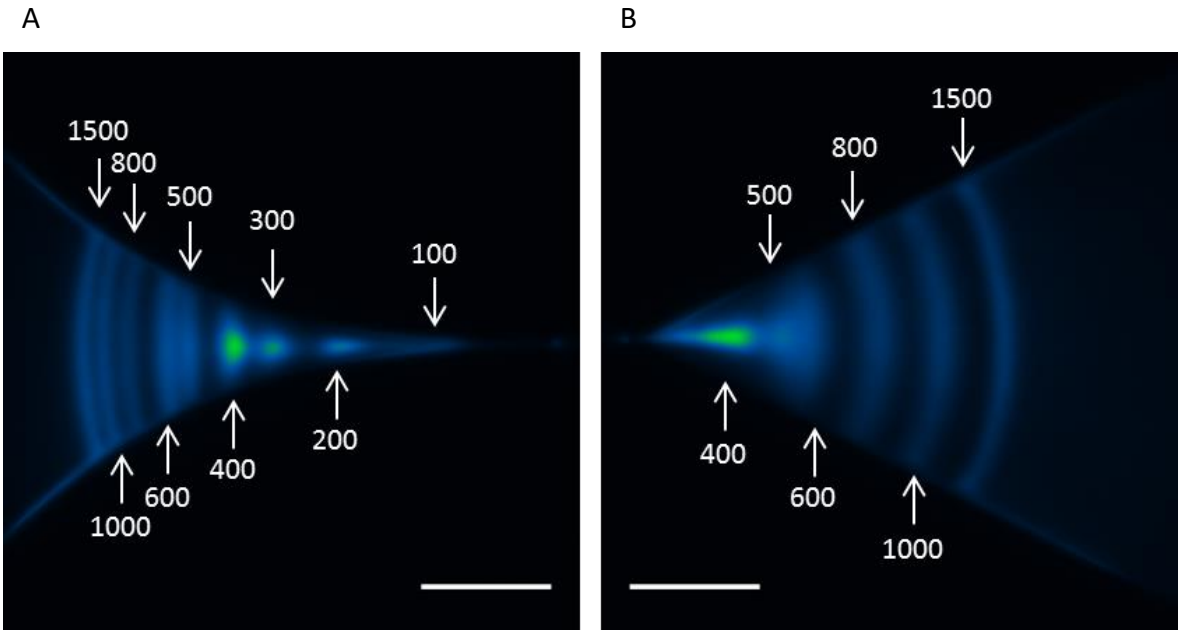


Figure 2.40. Comparaison de deux géométries de constriction (y = ax³ à gauche, et y = ax à droite) pour la séparation d'un 100 bp ladder avec des conditions opératoires identiques. Les tailles sont données en paires de bases. Les paramètres sont 7 bars et 125 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 3,9 cm/s et un champ électrique de 635 kV/m à la constriction. Le tampon contient du PVP à 5%. L'échelle correspond 150 µm.

2.2.2.4. Puces à double canaux

A terme, l'analyse d'ADN requiert la mesure de la taille des fragments d'un échantillon inconnu. Pour ce faire, les méthodes analytiques ont généralement recours à l'utilisation d'un échantillon de référence de taille connue ou d'un étalon. Par exemple l'électrophorèse sur gel permet la séparation simultanée, avec les mêmes conditions opératoires, de plusieurs échantillons et un marqueur de taille injectés dans différents puits. La taille des fragments est alors déduite par comparaison de la distance de migration des bandes (Figure 2.41A). En électrophorèse capillaire deux fragments de tailles connues (un de très haut poids moléculaire et un de très bas poids moléculaire) sont ajoutés dans l'échantillon et séparés dans le même canal. La taille des fragments est alors interpolée à partir des temps de passage devant le détecteur (Figure 2.41B).

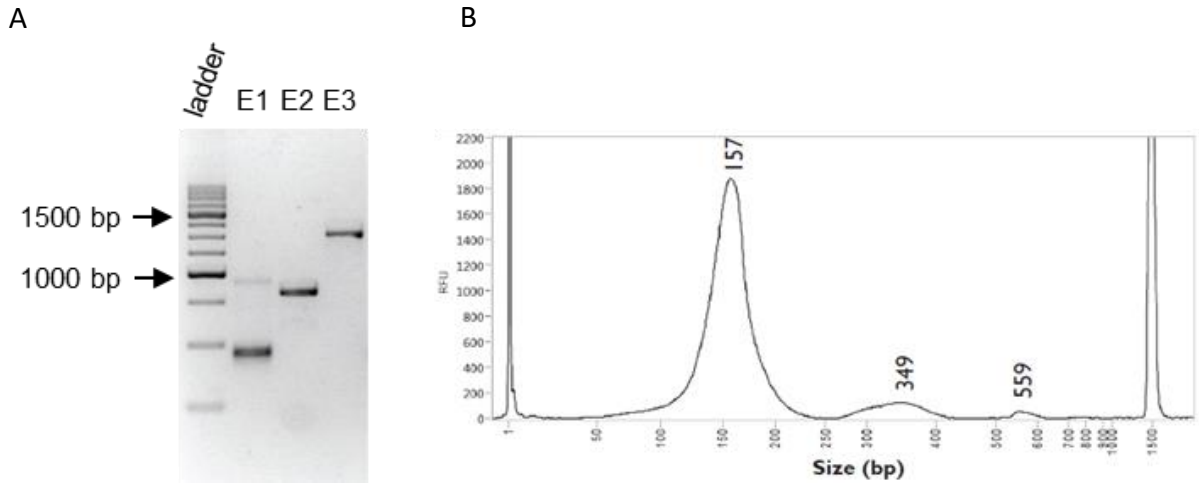


Figure 2.41. Détermination de la taille de fragments d'ADN après séparation. A) Exemple du gel d'agarose : les échantillons migrent en parallèle et sont comparés à un marqueur de taille. B) Exemple de l'électrophorèse capillaire : deux étalons (correspondant au pic à 1 bp à gauche et au pic à 1500 bp à droite) sont directement mélangés à l'échantillon.

Avec µLAS, le résultat des séparations sont très reproductibles. Ainsi il est tout à fait envisageable de séparer un échantillon, pendre une photographie, laver le canal, et passer une référence avec des conditions opératoires identiques pour comparaison. Toutefois ce protocole peut introduire des biais, et un manque de praticité. Par conséquent, nous nous sommes inspirés du système de puits des électrophorèses en gel pour réaliser notre système analytique. Sur nos puces, nous avons gravés deux canaux parfaitement identiques pour réaliser simultanément les séparations d'une référence et d'un échantillon. Nous nous sommes assurés de la reproductibilité de cette méthode en séparant simultanément dans les deux canaux un 100 bp ladder, avec des conditions opératoires identiques (Figure 2.42). Notons que nous avons également réfléchi à utiliser des marqueurs fluorescents différents dans un unique canal. Toutefois le marquage avec des intercalants étant dynamique, il existe un risque d'échange entre les molécules d'ADN. Pour contourner ce problème, il est possible de lier un fluorophore de manière covalente à l'ADN (à l'extrémité du brin en utilisant une transférase terminale par exemple), au risque d'alourdir les étapes pré-analytiques (marquage et de purification).

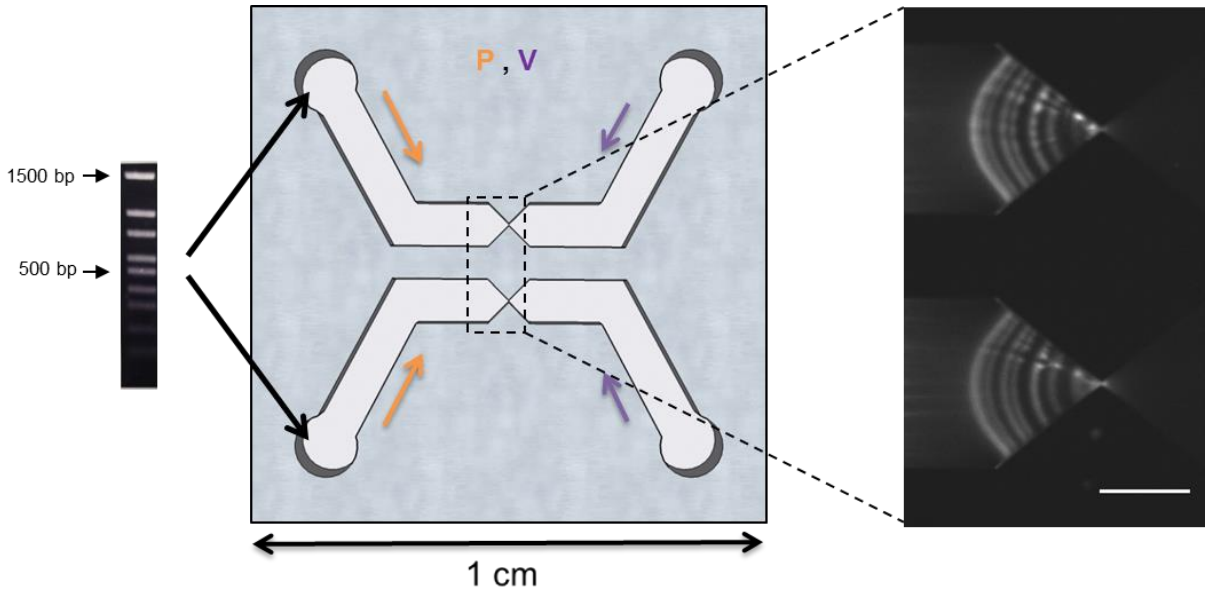


Figure 2.42. Représentation schématique d'une puce à double canaux. Lorsque le même échantillon (à gauche) est introduit dans les deux canaux et séparé avec des conditions opératoires de pression et de voltage identiques, le résultat de séparation est reproductible (micrographe à droite, les paramètres sont 6,8 bars et 100 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 8,1 cm/s et un champ électrique de 10500 kV/m à la constriction le tampon contient du PVP à 5%. échelle de 200 µm).

Dès lors, nous avons fait évoluer le système µLAS pour faciliter la mesure de taille des fragments.

2.2.3. La formulation du tampon

Le tampon de séparation est constitué de polymères dissous dans une solution de Tris-Borate-EDTA (TBE) 1x. Le TBE est un tampon classiquement utilisé en électrophorèse.

La viscoélasticité du tampon influence sur les champs de vitesses et la force transverse, et par conséquent la qualité de la séparation. Un travail poussé de comparaison des résultats de séparation en fonction de la viscosité et de l'élasticité du tampon est actuellement mené par Bayan Chami au sein de l'équipe. Pour notre part, nous nous contenterons d'énoncer quelques observations tirées de nos manipulations expérimentales.

La nature viscoélastique est indispensable à l'effet µLAS. En effet, nous avons mené des expériences dans un tampon de glycérol à 70% en masse[36], dont la viscosité µ = 25 cP équivaut à celle de nos tampons de séparation, mais sans propriété élastique. La séparation s'est révélée impossible quels que soient les paramètres opératoires, confirmant l'importance de l'élasticité pour

la génération de la force transverse (ce résultat est présenté en supplementary material de Ranchon et al[33]).

La viscosité et l'élasticité du tampon dépend du type polymères dissous (PEG, PVP, ou mélange), la taille de leurs chaînes (de quelques dizaines de kilo Daltons à plus d'un million de Daltons) et leur concentration (entre 1 et 20% en fonction du type de polymère utilisé). Pour que le fluide ait des propriétés viscoélastiques, il faut que les chaînes de polymères soient enchevêtrées et forment un réseau en solution. Pour cela, la concentration en polymères dissous doit être supérieure à la concentration critique de recouvrement $c^* = \frac{1}{\frac{4}{3}\pi R_g^3 N_A}$, avec R_g le rayon de giration déjà défini et N_A le nombre d'Avogadro. Pour donner un ordre d'idée, une solution de PVP de poids moléculaire 360 kDa (R_g ~ 25 nm[37]), à une concentration critique de recouvrement d'environ 25 µM. Il forme donc un réseau à partir d'une concentration de 0,9% en masse.

Dans nos expériences de séparation, nous utilisons majoritairement des solutions de PVP. Le polymère est acheté commercialement sous forme de poudre. Son poids moléculaire est censé être de 1,3 MDa mais des expériences de chromatographie réalisées par Picometrics ont montré que la taille des chaînes est très largement distribuée et que la dissolution du polymère est très lente avec une viscosité évoluant au cours du temps, nécessitant la préparation de stock de tampons à l'avance. L'augmentation de la concentration en polymères entraine une hausse de la viscosité de la solution et donc la diminution de la vitesse hydrodynamique pour une pression donnée (qui est elle-même limitée par l'équipement, c'est-à-dire les performances du générateur de pression et la résistance de la puce). Le résultat sur la force transverse et la qualité de la séparation est donc difficile à prédire. Pour des séparations de gamme de tailles de 100 bp à 50 kbp, nous avons observé que des concentrations en PVP comprises entre 2% et 5% conviennent. Toutefois, nous avons comparé des solutions de PVP 1,3 MDa à 5% et 2% pour la concentration de fragments <100 bp, qui s'est révélée impossible avec le tampon à 2% (Figure 2.43). La viscosité et l'élasticité du tampon augmentent avec la concentration en polymères dissous. A priori, pour une vitesse hydrodynamique équivalente, la force transverse est plus importante pour une solution plus concentrée, ce qui facilite l'arrêt des petites tailles de fragments. Par ailleurs, l'arrêt des petites tailles de fragments se fait généralement à proximité de la constriction (le champ électrique diminuant à distance de la constriction, la conservation de la valeur du champ électrique à distance de la constriction requiert d'appliquer des tensions trop élevées pour la puce). A cette position la vitesse de l'écoulement est très importante, particulièrement pour des solutions de faibles viscosités. Ainsi pour une solution de PVP 2% (η = 6 cP) et une différence de pression de 0,725 bar, la vitesse d'écoulement est déjà de 29 cm/s. L'utilisation d'un contrôleur de basses pressions (<1 bar) aurait été plus adapté à ces solutions peu visqueuses.

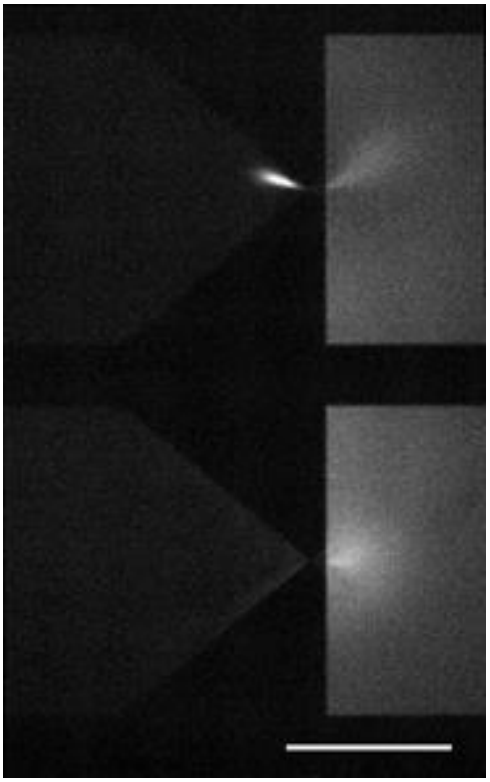


Figure 2.43. Comparaison de l'arrêt de fragment de 30 bp pour un tampon à 5% en PVP (en haut, avec 1,8 bar et 200V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 12,3 cm/s et un champ électrique de 29400 kV/m à la constriction) et 2% en PVP (en bas, avec 0,725 bar et 200V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 29 cm/s et un champ électrique de 29400 kV/m à la constriction). L'échelle correspond à 500 µm.

2.2.4. Les paramètres d'actionnement

L'actionnement hydrodynamique et électrophorétique est réalisé à l'aide d'un contrôleur de pression et d'un générateur de courant continu. Le contrôleur de pression est un ancien modèle (ref) vendu par Fluigent, pouvant délivrer des pressions jusqu'à 7 bar. La puce elle-même ne supporte pas des pressions plus beaucoup plus importantes à cause de la résistance mécanique du verre de 170 µm d'épaisseur, dans la mesure où la pression est appliquée directement au niveau du trou d'accès du canal. La tension appliquée est limitée par la tension de claquage de la puce qui se situe généralement autour de 350-400 V. Nous avons vu que les vitesses électrophorétiques et hydrodynamiques dépendent également de la viscosité de la solution, de la géométrie du canal et de la position dans le canal. Toutefois il est possible de donner une gamme de vitesse dans laquelle nous avons fait fonctionner nos dispositifs. Au niveau de la constriction, les vitesses d'écoulement étaient généralement comprises entre 5 et 30 cm/s et les champs électriques entre 1000 et 30000 kV/m. Les

expressions du débit, de la vitesse d'écoulement et du champ électrique sont données en annexe pour chaque design de canal utilisé pour nos travaux.

2.3. Précisions analytiques de µLAS

Après avoir décrit les développements réalisés sur le dispositif µLAS, nous allons nous intéresser à ses performances.

2.3.1. La gamme de taille et les différents types d'acides nucléiques

Pour nos expériences, nous utilisons principalement des échantillons dont les fragments sont dans la gamme de taille du 100 bp ladder (100 – 1500 bp). En effet nous avons vu dans le chapitre 1 que cela correspond aux tailles de fragments attendues dans la circulation de patients atteints de cancer. Toutefois pendant sa thèse, Hubert Ranchon a montré que la technologie était compatible avec de l'ADN λ de 48,5 kbp dans un canal droit de 2 µm hauteur. Pour nos géométries de puces dotées d'une constriction, nous avons montré la séparation des bandes d'un kb ladder jusqu'à 4 kb (Figure 2.44). En ce qui concerne des gammes <100 bp, nous avons déjà présenté la concentration de fragments de 30 bp (Figure 2.43).

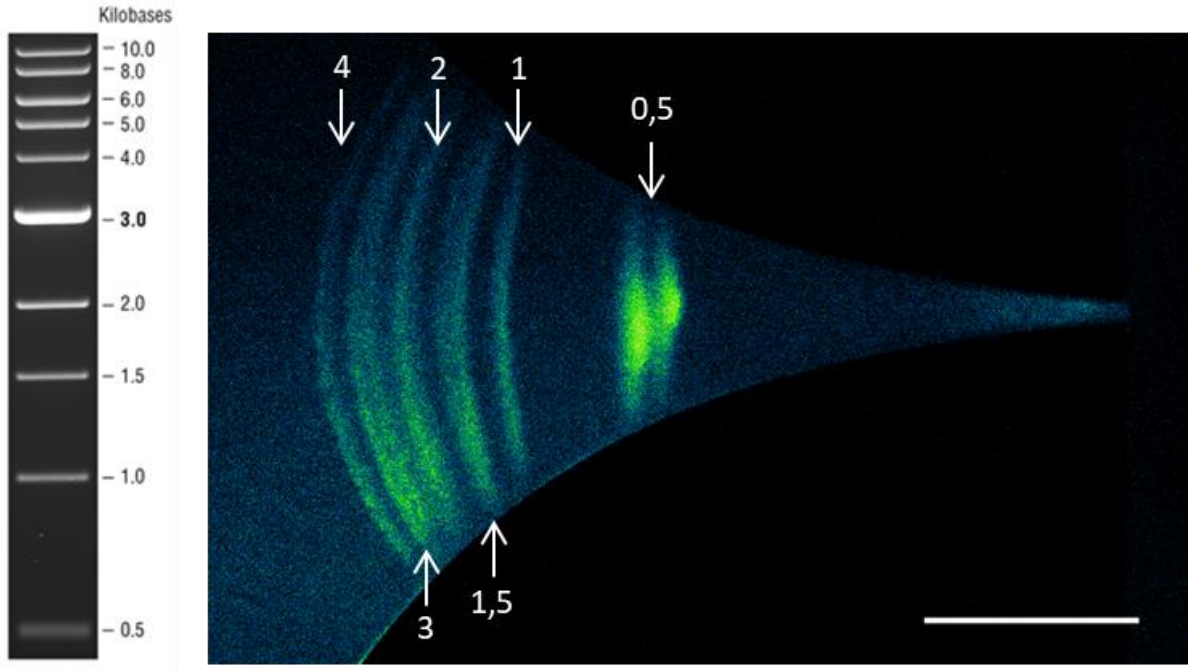


Figure 2.44. Séparation d'un kb ladder commercial de New England Biolabs (à gauche) par µLAS (à droite). Les paramètres sont 2 bars et 85 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 5,7 cm/s et un champ électrique de 997 kV/m à la constriction. Le tampon contient du PVP à 5%. L'échelle est 200 µm.

Pour résumer, le bon fonctionnement de la technologie µLAS a été observé pour des gammes de tailles allant de 30 bp à 50 kbp. Toutefois il n'est pas exclu que la technologie fonctionne pour des tailles supérieures. Des travaux sont actuellement effectués chez Picometrics pour montrer la séparation de tailles >100 kbp sous format capillaire. Même si elle n'est pas directement utile à notre thèse, la séparation de ces grandes tailles n'est pas anodine car nous avons déjà expliqué qu'elle est aujourd'hui réalisée par électrophorèse en champs pulsés en plusieurs heures.

En ce qui concerne les autres types d'acides nucléiques, la séparation a été démontrée pour de l'ARN et de l'ADN simple brin (ssDNA). Sous sa forme simple brin, l'ADN est un polymère plus flexible que sous sa forme double brin. De plus, la différence de poids moléculaire entre deux tailles de ssDNA est réduite, rendant la séparation plus difficile. La perspective de pouvoir analyser de l'ARN est intéressante. Par ailleurs, la séparation du ssDNA, constitue un jalon pour la détection de séquence. Cette dernière fonction est développée dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

2.3.2. La précision de l'analyse par µLAS

Afin d'avoir un système d'analyse de l'ADN fiable, la mesure de la taille des fragments et de leurs concentrations doit être précise.

2.3.2.1. Mesure de la taille

Pour évaluer la précision de la mesure de taille, nous avons comparé un échantillon constitué de trois tailles de fragments connues (466, 796 et 1536 bp obtenus par amplification PCR de plasmides) avec une référence (100 bp ladder) dans une puce à double canaux (Figure 2.45). Après 30 secondes de séparation à 6 bars et 82 V, correspondant à une vitesse maximale d'écoulement de 7,1 cm/s et 6888 kV/m, un profil d'intensité est établi au centre du canal (suivant les flèches rouge et bleu, Figure 2.45B). Le tracé de l'intensité (correspondant à leurs positions) des bandes en fonction de la distance à la constriction pour l'échantillon et la référence permet d'extrapoler linéairement la taille des fragments de l'échantillon (Figure 2.45C). La taille des trois fragments ciblés est évaluée à 456 bp, 788 bp et 1550 bp, montrant une différence entre la mesure et les tailles attendues inférieure à 3%, ce qui est tout à fait comparable à la résolution affichée par les systèmes électrophorétiques du marché.

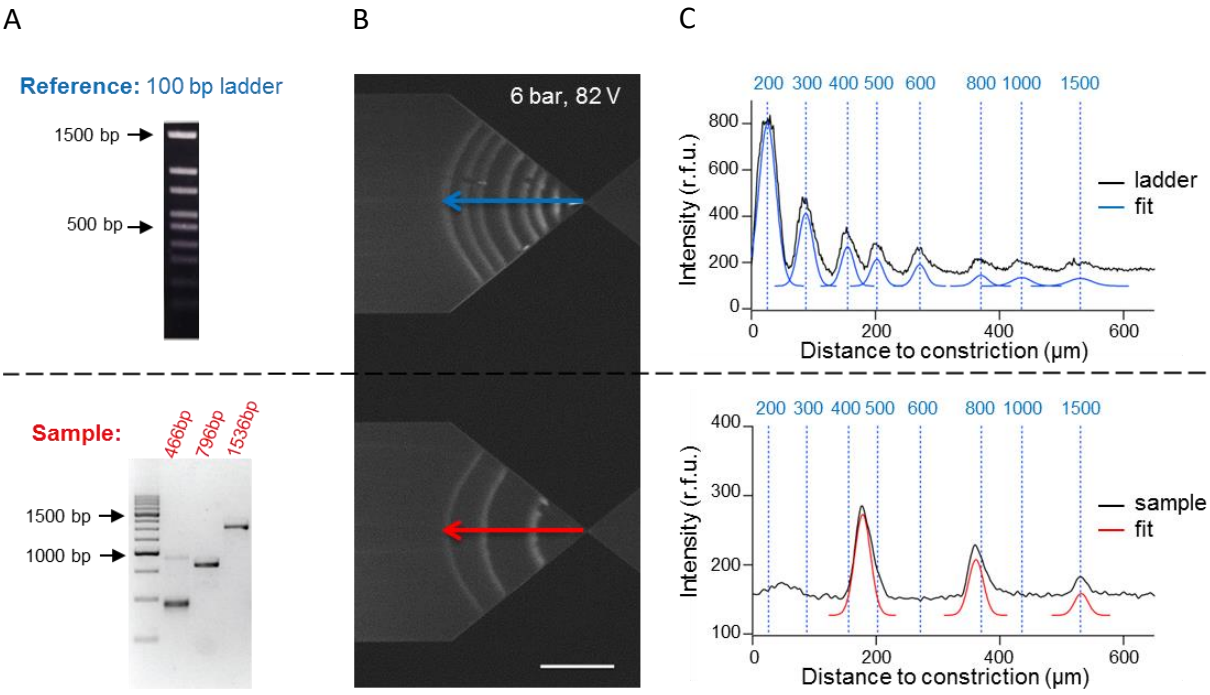


Figure 2.45. Evaluation de la taille de fragments avec une précision >97%. A) Séparation sur gel du 100 bp ladder et de l'échantillon. B) Séparation par µLAS dans sa version double canaux. C) Tracé de l'intensité au centre du canal en fonction de la distance à la constriction. L'échelle est 300 µm.

2.3.2.2. Mesure de la concentration

L'intensité de fluorescence de chaque bande est proportionnelle à la concentration des fragments tant qu'il n'y a pas d'effets d'extinction (quenching) ou de saturation du signal. Ainsi il est possible d'avoir une estimation de la concentration des fragments par comparaison aux fragments de tailles similaires de la référence (la vitesse d'enrichissement et l'intensité du marquage étant dépendant de la taille des molécules). Pour ce faire, l'aire de chaque bande est intégrée tel que illustré sur la Figure 2.46A. La concentration des bandes de l'échantillon a été mesurée à 80 ng/mL au Nanodrop. Les concentrations des fragments 400, 800 et 1500 bp de la référence sont 40, 80 et 150 ng/mL, respectivement. La comparaison de l'intensité nous permet d'estimer la concentration à 58, 92 et 101 ng/mL pour les fragments de l'échantillon de 466, 796 et 1536 bp, respectivement. Cette méthode permet donc d'avoir une estimation semi-quantitative de la concentration avec une précision de l'ordre de 70%.

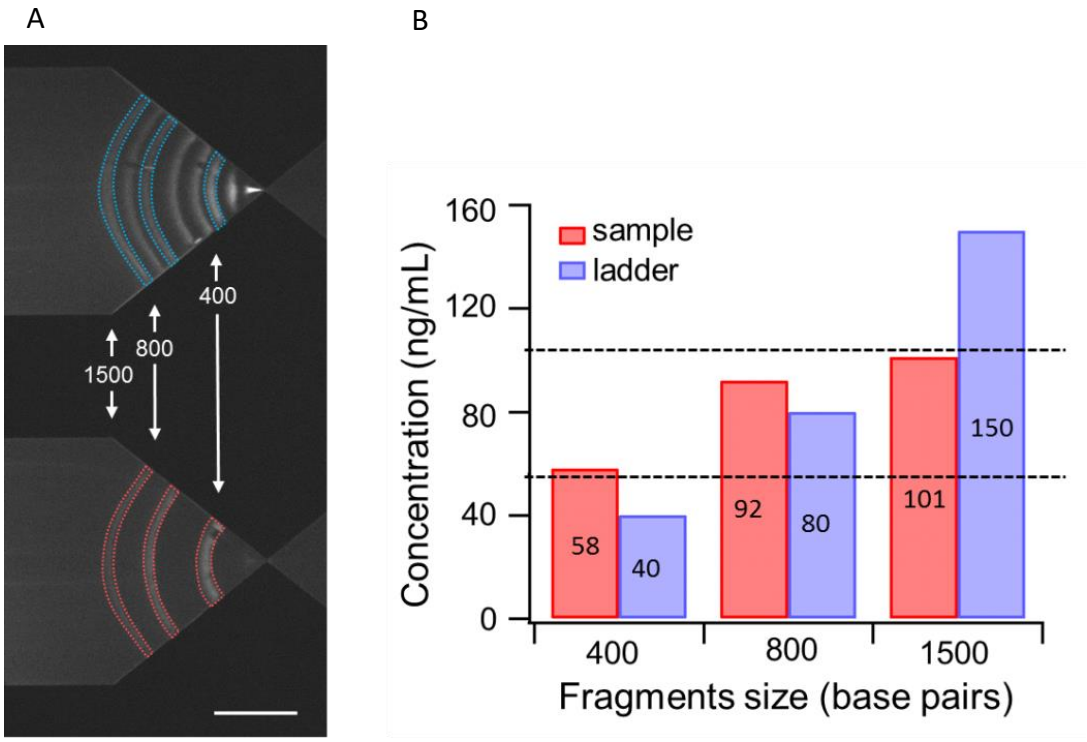


Figure 2.46. Evaluation de la concentration des fragments avec une précision >70%. A) Intégration de l'intensité des bandes avec pour référence la concentration des fragments de 400, 800 et 1500 bp du ladder. B) Graphe représentant la concentration des fragments en fonction de leur tailles.

2.3.3. Facteurs de concentration et sensibilité de µLAS

La sensibilité de µLAS est logiquement corrélée avec sa capacité à concentrer les espèces ciblées. En théorie, nous avons vu que µLAS permettait d'arrêter tous les fragments à une position donnée du canal. Localement, la focalisation des molécules est quasiment instantanée. Par conséquent le facteur de concentration est seulement limité par le débit qui amène les molécules à la position d'arrêt. Le débit peut être augmenté par optimisation de la géométrie du canal, du tampon viscoélastique et du couple de pression et voltage appliqué. De plus, nous avons vu que la vitesse de concentration est plus importante pour les petites tailles de molécule qui suivent des lignes de champs plus rapides. L'évaluation des facteurs de concentration est réalisée par suivi de l'augmentation de l'intensité de chaque bande au cours du temps (Figure 2.47). Pour des conditions opératoires données, on observe expérimentalement que la vitesse de concentration dépend de la taille des molécules (Figure 2.47C, graphe de gauche). Pour une taille de fragment donné, on observe que la vitesse de concentration dépend des paramètres d'actionnement (Figure 2.47, panneau de droite).

Notons tout de même que pour des échantillons très concentrés (>1 µg/mL), le détecteur peut être saturé en quelques secondes. De plus nous avons vu dans le chapitre 1 qu'au-delà d'un certain seuil, le champ électrique et par conséquent, le mécanisme de concentration peuvent être perturbés localement[38]. Enfin, nous sommes également limité par la solubilité de l'ADN en solution (~10 mM dans de l'eau). Pour une concentration de départ en ADN de 1 µg/mL, si l'on considère un enrichissement par un facteur 1000 et l'accumulation des molécules d'ADN aux parois sur 10% de la hauteur du canal, on obtient une concentration locale d'environ 10 mg/mL (~15 mM). A plusieurs reprises, nous avons observé expérimentalement des déplacements de la position des bandes au cours de l'enrichissement que nous attribuons à ces phénomènes de saturations en concentration.

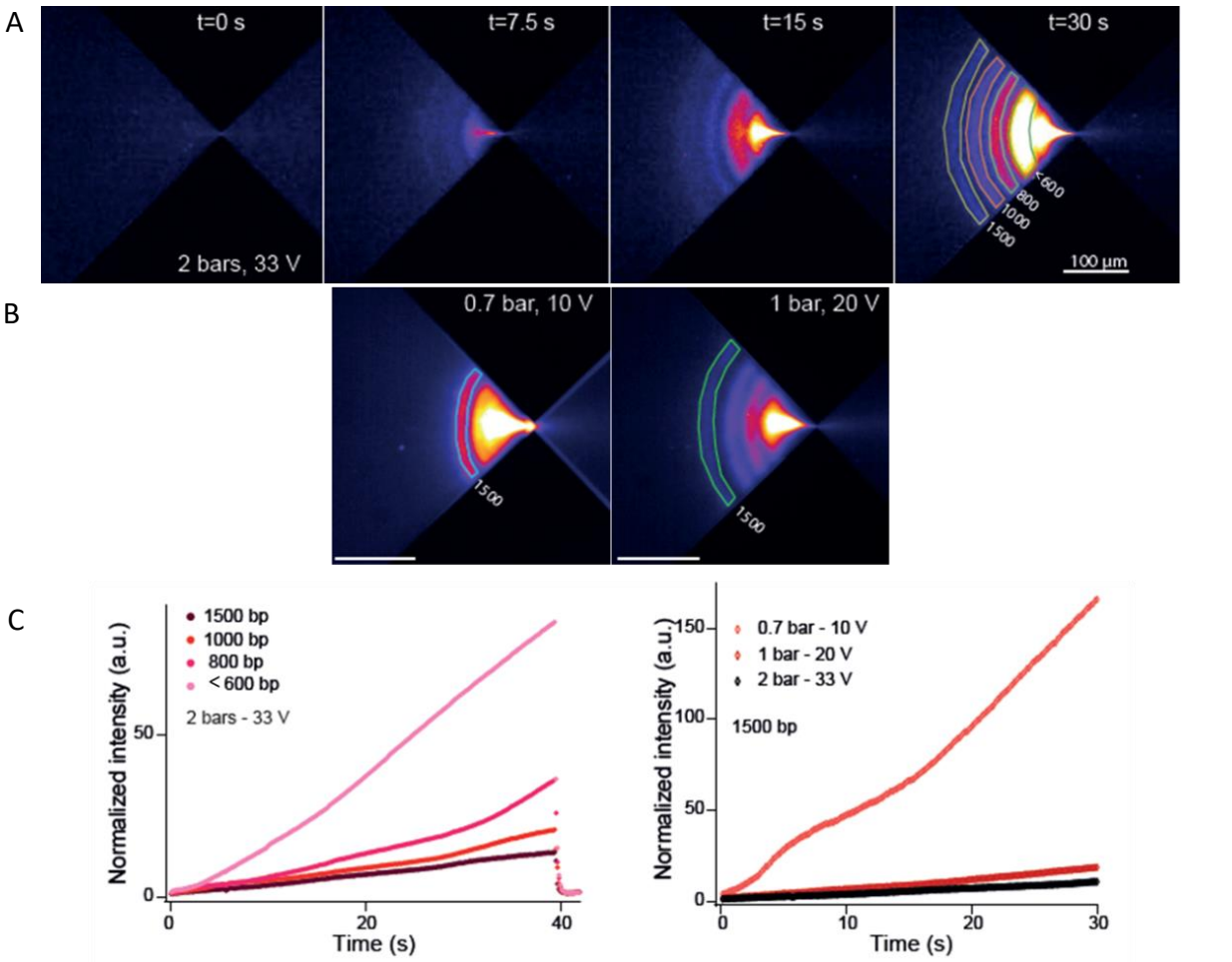


Figure 2.47. Détermination de la vitesse de concentration des fragments. A) Série de la séparation d'un 100 bp ladder sous 2 bars et 33V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 11,4 cm/s et un champ électrique de 2145 kV/m à la constriction. B) Résultat de séparation après 30 secondes pour différents paramètres opératoires. L'échelle est 100 µm. C) Tracé de l'intensité de fluorescence normalisée au cours du temps pour différentes tailles de fragments sous les mêmes conditions opératoires (panneau de gauche), pour une taille de fragment sous différentes conditions opératoires (panneau de droite). Notons qu'à 40 secondes, l'intensité chute brutalement sur le graphe de gauche car on a relâché le champ électrique. Adapté de Ranchon et al.[33].

En procédant ainsi, nous avons observé jusqu'à des facteurs d'enrichissement pouvant atteindre 723 par minute pour des fragments de 30 bp (cette expérience sera présentée dans le chapitre 3, partie 3.2.4).

Nous avons vu qu'en dehors du facteur de concentration, la limite de détection dépend principalement de l'optique. De ce point de vue, notons que l'utilisation d'un microscope nous permet de bénéficier d'une optique très performante par rapport à un dispositif muni d'un détecteur intégré au format commercial. Pour des échantillons très dilués, la détection peut nécessiter de concentrer l'échantillon pendant plusieurs minutes. La Figure 2.48 montre le résultat de la concentration d'un 100 bp ladder dont chaque fragment est à une concentration d'environ 100 pg/mL. A partir de 5 minutes, toutes les tailles de fragments sont facilement détectées. Lors de nos expériences nous avons détecté des concentrations minimales de l'ordre de 1 pg/mL en 15 minutes pour un fragment de 300 bp. Notons toutefois que la limite de détection est donnée pour l'échantillon dilué dans le tampon viscoélastique. Cette dilution peut être tout de même limitée à un facteur 2.

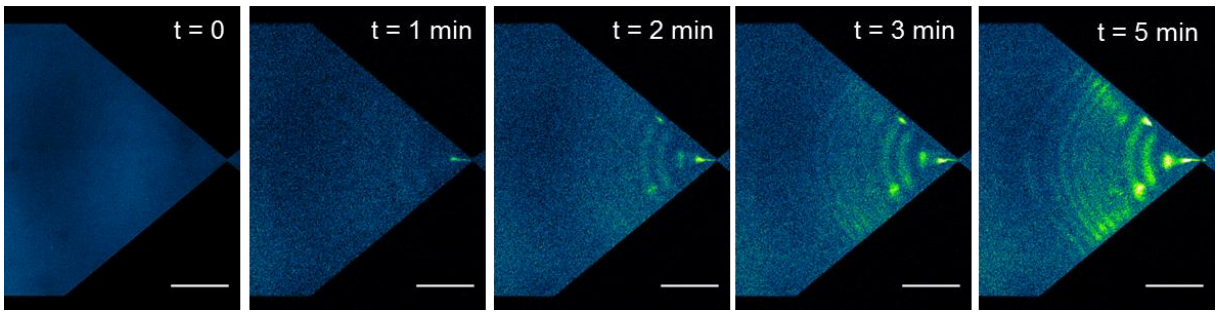


Figure 2.48. Détection de fragments d'ADN dilués à 100 pg/mL. Le bruit de fond à t=0 a été soustrait des photos à t=1,2,3,5 min. Les paramètres sont 4 bars et 80V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 27,4 cm/s et un champ électrique de 11760 kV/m à la constriction. Le tampon contient du PVP à 5%. L'échelle correspond à 300 µm.

2.4. Comparaison de µLAS avec les systèmes d'électrophorèses commerciaux

Le Tableau 2.6 résume les performances des principaux systèmes d'électrophorèses commerciaux et de µLAS. Les performances de la version de µLAS, transférée industriellement sous un format capillaire (BIABooster, Picometrics Technologies), sont également présentées.

Tableau 2.6. Comparaison des performances de µLAS et des différents systèmes d'électrophorèses commerciaux

Instrument (Company)	Format	Produit (ou référence)	Volume d'injection minimal (µL)	Gamme de taille (bp)	Résolution maximale (bp)	Limite de détection par fragments (ng/mL)	Temps d'analyse (min)
LAAS-CNRS	Puce	µLAS	1	30-50000	3	1	5
Picometrics Technologies	Capillaire	BIABooster	0,85	100-1500	3	1	20
Fragment Analyzer (Advanced Analytical)	Capillaire	High Sensitivity Small Fragment Analysis Kit	24 (2 µL d'échantillon requis pour dilution)	50-1500	3	5	25 à 80
		High Sensitivity Genomic DNA Analysis Kit		50-4000	13	50	
Bioanalyzer (Agilent)	Puce	High sensitivity DNA kit	6 (1 µL d'échantillon requis pour dilution)	50-7000	5	100	45
TapeStation (Agilent)	Puce	High Sensitivity D1000 Screen Tape	2	35-1000	5	5	20
		Genomic DNA ScreenTape		200 à >60000	30	500	
Experion (BIORAD)	Puce	DNA 1K	1	15-1500	5	500	40
QIAxcel (Qiagen)	Puce	DNA High Resolution Kit	0,1	15-5000	3	100	7 à 12
LabChip GX Touch (PerkinELmer)	Puce	DNA High Sensitivity	10 (2 µL d'échantillon requis pour dilution)	50-5000	5	5	180 (pour 96 échantillons)

Conclusion du chapitre 2

Ce chapitre nous a permis d'introduire le principe de fonctionnement de la technologie µLAS. En se positionnant par rapport à la littérature sur la focalisation de particules, nous avons exposé le caractère innovant de la concentration sélective sans matrice solide. Nous avons montré que cette technologie repose sur la génération d'une force transverse, sous l'action simultanée d'un écoulement hydrodynamique et d'un champ électrique dans un fluide viscoélastique. Nous avons proposé une expression pour cette force transverse, et montré la dépendance en fonction de la taille de la molécule et de la viscoélasticité de la solution. Dans un second temps, nous avons présenté les développements réalisés pour obtenir un dispositif performant. Ainsi un travail d'optimisation a été entrepris sur la géométrie du canal, la formulation du tampon de séparation et l'intégration du système en général. Enfin nous avons montré que les performances de µLAS en termes de temps d'analyses, de résolution de séparations, de facteurs de concentration (cf. chapitre 1, Figure 1.22) et de limites de détection n'avaient rien à envier aux systèmes d'électrophorèses commerciaux, tout en soulignant que des développements restent nécessaires pour améliorer les débits. Dans la suite de ce manuscrit, nous allons nous intéresser au développement d'une fonction de détection spécifique de séquences.

Références du chapitre 2

1. Viovy, J.-L. Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Rev. Mod. Phys.* **72,** 813–872 (2000).
2. Sartori, A., Barbier, V. & Viovy, J.-L. Sieving mechanisms in polymeric matrices. *ELECTROPHORESIS* **24,** 421–440 (2003).
3. Desruisseaux, C., Drouin, G. & Slater, G. W. Electrophoresis of Composite Molecular Objects. 2. Competition between Sieving and Frictional Effects in Polymer Solutions. *Macromolecules* **34,** 5280–5286 (2001).
4. Stellwagen, N. C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* **30,** S188–S195 (2009).
5. Volkmuth, W. D. & Austin, R. H. DNA electrophoresis in microlithographic arrays. *Nature* **358,** 600–602 (1992).
6. Dorfman, K. D., King, S. B., Olson, D. W., Thomas, J. D. P. & Tree, D. R. Beyond gel electrophoresis: microfluidic separations, fluorescence burst analysis, and DNA stretching. *Chem. Rev.* **113,** 2584–2667 (2013).
7. Noolandi, J. A new concept for sequencing DNA by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* **13,** 394–395 (1992).
8. Heller, C. *et al.* Free-solution electrophoresis of DNA. *J. Chromatogr. A* **806,** 113–121 (1998).
9. Won, J.-I. Recent advances in DNA sequencing by End-Labeled Free-Solution Electrophoresis (ELFSE). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **11,** 179–186 (2006).
10. Meagher, R. J. *et al.* End-labeled free-solution electrophoresis of DNA. *Electrophoresis* **26,** 331–350 (2005).
11. Tijssen, R., Bos, J. & Van Kreveld, M. E. Hydrodynamic chromatography of macromolecules in open microcapillary tubes. *Anal. Chem.* **58,** 3036–3044 (1986).

12. Noel, R. J., Gooding, K. M., Regnier, F. E., Orr, C. & Mullins, M. E. Capillary hydrodynamic chromatography. *J. Chromatogr. A* **166,** 373–382 (1978).

13. Liu, K. J., Rane, T. D., Zhang, Y. & Wang, T.-H. Single-Molecule Analysis Enables Free Solution Hydrodynamic Separation Using Yoctomole Levels of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **133,** 6898–6901 (2011).

14. Wang, X. *et al.* Free solution hydrodynamic separation of DNA fragments from 75 to 106,000 base pairs in a single run. *J. Am. Chem. Soc.* **132,** 40–41 (2010).

15. Wang, X. *et al.* Resolving DNA in free solution. *TrAC Trends Anal. Chem.* **35,** 122–134 (2012).

16. Wang, X. *et al.* Pressure-Induced Transport of DNA Confined in Narrow Capillary Channels. *J. Am. Chem. Soc.* **134,** 7400–7405 (2012).

17. Zhu, Z. *et al.* Integrated Bare Narrow Capillary–Hydrodynamic Chromatographic System for Free-Solution DNA Separation at the Single-Molecule Level. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **52,** (2013).

18. WILLIAMS, P. S., LEE, S. & GIDDINGS, J. C. Characterization of Hydrodynamic Lift Forces by Field-Flow Fractionation. Inertial and Near-Wall Lift Forces. *Chem. Eng. Commun.* **130,** 143–166 (1994).

19. WILLIAMS, P. S., KOCH, T. & GIDDINGS, J. C. Characterization of Near-Wall Hydrodynamic Lift Forces Using Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Chem. Eng. Commun.* **111,** 121–147 (1992).

20. Messaud, F. A. *et al.* An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Prog. Polym. Sci.* **34,** 351–368 (2009).

21. Zheng, J. & Yeung, E. S. Anomalous radial migration of single DNA molecules in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **74,** 4536–4547 (2002).

22. Zheng, J. & Yeung, E. S. Mechanism for the Separation of Large Molecules Based on Radial Migration in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **75,** 3675–3680 (2003).

23. Seo, K. W., Byeon, H. J., Huh, H. K. & Lee, S. J. Particle migration and single-line particle focusing in microscale pipe flow of viscoelastic fluids. *RSC Adv.* **4,** 3512–3520 (2013).

24. Leshansky, A. M., Bransky, A., Korin, N. & Dinnar, U. Tunable nonlinear viscoelastic 'focusing' in a microfluidic device. *Phys. Rev. Lett.* **98,** 234501 (2007).

25. Del Giudice, F. *et al.* Particle alignment in a viscoelastic liquid flowing in a square-shaped microchannel. *Lab. Chip* **13,** 4263–4271 (2013).

26. Kim, J. Y., Ahn, S. W., Lee, S. S. & Kim, J. M. Lateral migration and focusing of colloidal particles and DNA molecules under viscoelastic flow. *Lab. Chip* **12,** 2807–2814 (2012).

27. Kim, B. & Kim, J. M. Elasto-inertial particle focusing under the viscoelastic flow of DNA solution in a square channel. *Biomicrofluidics* **10,** 024111 (2016).

28. Kang, K., Lee, S. S., Hyun, K., Lee, S. J. & Kim, J. M. DNA-based highly tunable particle focuser. *Nat. Commun.* **4,** (2013).

29. D'Avino, G., Greco, F. & Maffettone, P. L. Particle Migration due to Viscoelasticity of the Suspending Liquid and Its Relevance in Microfluidic Devices. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **49,** 341–360 (2017).

30. Dhahir, S. A. & Walters, K. On Non-Newtonian Flow Past a Cylinder in a Confined Flow. *J. Rheol.* **33,** 781–804 (1989).

31. Carew, E. O. A. & Townsend, P. Slow visco-elastic flow past a cylinder in a rectangular channel. *Rheol. Acta* **30,** 58–64 (1991).

32. Lee, E. F., Koch, D. L. & Joo, Y. L. Cross-stream forces and velocities of fixed and freely suspended particles in viscoelastic Poiseuille flow: Perturbation and numerical analyses. *J. Non-Newton. Fluid Mech.* **165,** 1309–1327 (2010).

33. Ranchon, H. *et al.* DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids. *Lab Chip* **16,** 1243–1253 (2016).

34. McDonald, J. C. *et al.* Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* **21,** 27–40 (2000).

35. Bartzsch, H. *et al.* Electrical insulation properties of sputter-deposited SiO_2, Si_3N_4 and Al_2O_3 films at room temperature and 400 °C. *Phys. Status Solidi A* **206,** 514–519 (2009).

36. Segur, J. B. & Oberstar, H. E. Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions. *Ind. Eng. Chem.* **43,** 2117–2120 (1951).

37. McFarlane, N. L., Wagner, N. J., Kaler, E. W. & Lynch, M. L. Poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(vinyl pyrolidone) (PVP) induce different changes in the colloid stability of nanoparticles. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **26,** 13823–13830 (2010).

38. Ross, D. & Locascio, L. E. Microfluidic temperature gradient focusing. *Anal. Chem.* **74,** 2556–2564 (2002).

Chapitre 3.

Vers la détection spécifique de séquences de l'ADN

Pour l'application à la détection de l'ADN tumoral circulant

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que µLAS permettait réaliser la concentration, la séparation et la détection selon la taille de l'ADN. Le développement d'une fonction de reconnaissance de séquences ciblées constitue la dernière brique technologique pour la réalisation d'un système d'analyse intégrant l'ensemble des fonctions analytiques de la génomique. Cette perspective est particulièrement séduisante pour la caractérisation de l'ADN tumoral circulant, dans la mesure où la détection de mutations constitue un biomarqueur de choix en oncologie. Cet objectif nécessite de réaliser des systèmes à haute sensibilité, ce que nous proposons de mettre en œuvre en tirant partie du concentrateur µLAS.

Dans ce chapitre, nous présenterons d'abord différentes méthodes classiques de détection de cibles génétiques par voie optique. Nous insisterons sur leurs avantages et limitations, qui tiennent en particulier au bruit de fond de mesure. Nous présenterons différentes approches pour réduire ce bruit de fond, grâce à une ingénierie de la sonde (de type « molecular beacon » ou balise moléculaire en français) pour allumer le signal de fluorescence seulement en cas de reconnaissance moléculaire. Nous montrerons que µLAS permet une détection directe en volume, par amplification sélective du signal à bruit de fond constant. Ces résultats, présentés dans ce chapitre, font l'objet d'un brevet déposé pendant notre thèse (FR1756234).

3.1. Principe de détection de séquences spécifiques

Au-delà des méthodes de séquençage, qui permettent de lire tout un génome, le diagnostic moléculaire s'est beaucoup développé autour de la détection de la présence d'une séquence d'ADN porteuse ou non d'une mutation ciblée, en se focalisant sur une longueur de 20 à 50 paires de bases. Le principe de détection est fondé sur l'utilisation d'un oligonucléotide synthétique (dite sonde) complémentaire à la séquence ciblée. L'interaction peut se manifester par une modification de propriétés physiques de type changement de masse ou d'indice optique, qui sont lues par un détecteur mécanique ou plasmonique pour ne citer que quelques exemples (pour une revue voir Spoto et Corradini[1]). On dit de ces technologies qu'elles sont sans marquage. Il est d'autre part possible de modifier la sonde avec des groupements actifs optiquement, chimiquement ou électro-chimiquement, et donc de marquer un signal de reconnaissance moléculaire. Le marquage en fluorescence est certainement la voie de détection la plus courante, car elle est compatible avec l'utilisation de caméras optiques, mais elle nécessite de limiter le bruit de fond introduit par les sondes non hybridées. Nous avons choisi d'utiliser une détection optique, plus facile à intégrer et à mettre en œuvre dans notre système, que les approches optiques et mécaniques. Dans la suite de ce chapitre nous présenterons quelques exemples de techniques de détection en fluorescence (pour un inventaire plus exhaustif, il est possible de se référer à la revue de Juskowiak[2]).

3.1.1. Détection par fluorescence en surface

La méthode de détection historique est fondée sur l'hybridation de nucléotides fluorescents sur des surfaces. Ces surfaces peuvent être tapissées de sondes génétiques, comme dans les puces à ADN (Affymetrix, ThermoFisher), ou être le support de cellules en culture perméabilisées. Dans ce dernier cas, l'ADN génomique de cellules peut être directement marqué dans les cellules par FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)[3,4]. Brièvement, des cellules sont fixées sur des lamelles de microscope pour observation. L'ADN cellulaire est dénaturé sous sa forme simple brin par chauffage à 95°C. Les sondes marquées pénètrent à l'intérieur du noyau et s'hybrident à leurs cibles. Une étape de lavage permet d'éliminer les sondes en excès (Figure 3.49A). Cette technologie, si populaire soit-elle dans les laboratoires de biologie des eucaryotes, est très lente à mettre en œuvre, parce qu'elle nécessite plusieurs rinçages consécutifs.

Pour les puces à ADN[5–7], une solution à analyser, comprenant un mélange de séquences, est d'abord marquée en fluorescence grâce à une modification sur les extrémités d'ADN[8], puis mise en

contact avec les sondes de surface. Une étape de lavage est nécessaire pour éliminer les séquences non spécifiques, mais son temps doit être calibré car l'interaction non covalente entre les duplex d'ADN est progressivement rompue. Moyennant ce calibrage, cette technologie permet de détecter la présence d'une cible et de mesurer sa concentration. De plus, les réseaux des puces à ADN présentent l'avantage de permettre une lecture multiplexée en utilisant plusieurs séquences de sondes réparties sur différents spots. Toutefois, le signal est linéaire pour des gammes de concentrations limitées (la limite de détection variant de 1 à 10 copies de gènes par cellules, une sensibilité encore insuffisante pour détecter des changements pertinents pour des gènes de faibles abondances, comme les facteurs de transcription[9]). Pour des concentrations élevées en cibles, le réseau peut saturer tandis que pour de faibles concentrations, les cinétiques d'hybridation limitent la capture. De plus, il est difficile d'obtenir des réseaux dont les sondes discriminent des séquences très proches. Aujourd'hui, cette technique est rapidement supplantée par les techniques de séquençage à haut débits (Figure 3.49B).

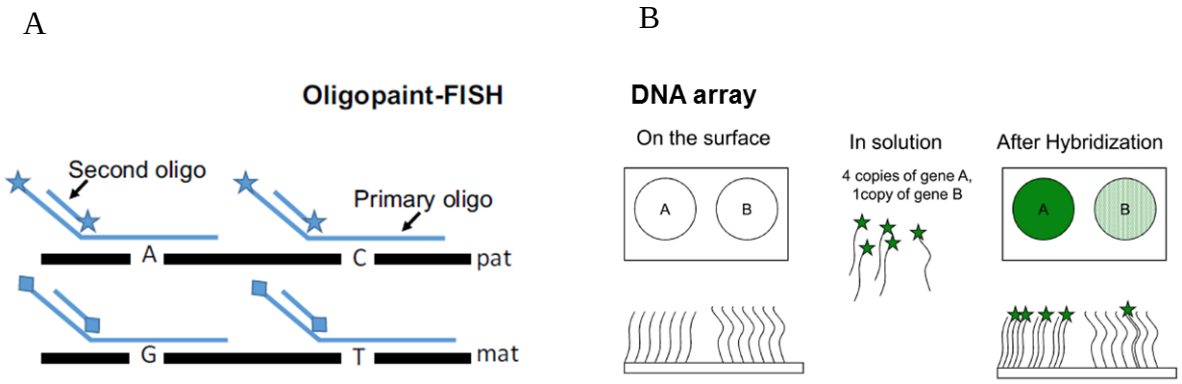


Figure 3.49. Méthodes de détection par fluorescence de séquences en surface. A) Exemple de méthode FISH de type « Oligopaint » utilisant première sonde marquée ciblant une SNP et une seconde sonde marquée pour accroître la différence de signal entre un chromosome paternel (pat) et maternel (mat). Adapté de Cui et al.[4].B) Représentation schématique d'un réseau d'ADN vu de dessus et de côté. Deux spots A et B sur une surface sont représentés avant et après hybridation. Adapté de Bumgarner et al.[5].

3.1.2. Détection par fluorescence en volume

En solution, des stratégies alternatives au lavage ont été développées pour éliminer le bruit de fond en conservant le signal. Des stratégies d'ingénierie de la sonde visent à exalter le signal suite à l'hybridation. Par exemple, les balises moléculaires sont des séquences nucléotidiques simples brins (15-30 bases) capables de s'hybrider avec une cible. En absence de cible, sa structure en forme de tête d'épingle maintient à proximité un fluorochrome et un suppresseur de fluorescence, placés à ses extrémités respectives (Figure 3.50). En présence de la cible, l'hybridation provoque l'ouverture

de la structure et la restauration de la fluorescence[10]. L'ouverture des balises moléculaires nécessite généralement une forte complémentarité avec la cible, améliorant la spécificité par rapport aux sondes linéaires[11,12]. Baker et al. ont montré l'utilisation de balises moléculaires pour la quantification de séquences de microARN spécifiques en solution pour des concentrations *in vitro* inférieures à 1 nM[13]. Notons toutefois que l'état des balises moléculaires est un équilibre entre les conformations ouvertes ou fermées même en absence de cible. Ainsi il existe toujours un bruit de fond résiduel de la solution, limitant la sensibilité de la mesure. Pour gagner en sensibilité, ces sondes peuvent également être immobilisées sur des réseaux d'ADN[14–16].

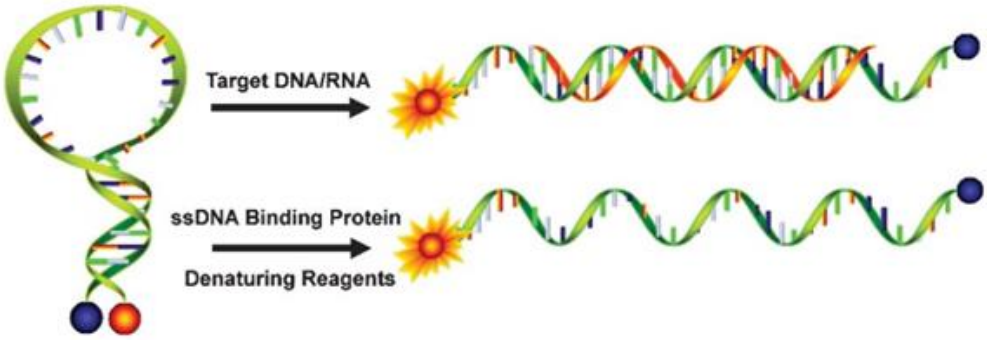


Figure 3.50. Principe de fonctionnement d'une balise moléculaire. La fluorescence est restaurée lors de l'hybridation avec la cible. Tiré de Tan et al.[10].

Une autre approche pour augmenter le signal par rapport au bruit de fond consiste à coupler la détection avec une amplification PCR. C'est le principe de la PCR quantitative qui a été décrit dans le chapitre 1 (1.3.3.1). Pour la détection, il est possible d'utiliser des sondes de type TaqMan (ThermoFisher) par exemple[17]. Cette technique a été utilisée pour l'amplification et la détection de quelques copies (4 copies) dans des volumes réactionnels de 10 µL[18]. La sonde est un oligonucléotide présentant un rapporteur fluorescent à son extrémité 5' et un extincteur de fluorescence à son extrémité 3' qui s'hybride avec la séquence cible. Tant que la sonde est intacte, la proximité avec l'extincteur de fluorescence limite le signal. Pendant l'amplification de la séquence cible, l'utilisation d'une Taq DNA polymerase avec une activité exonucléase 5'-3' dégrade la sonde hybridée séparant le rapporteur fluorescent de l'extincteur (Figure 3.51). La dégradation de la sonde intervient au même moment que l'amplification de l'ADN, ce qui permet de multiplier le signal de détection pour un nombre limité de cible dans l'échantillon à tester.

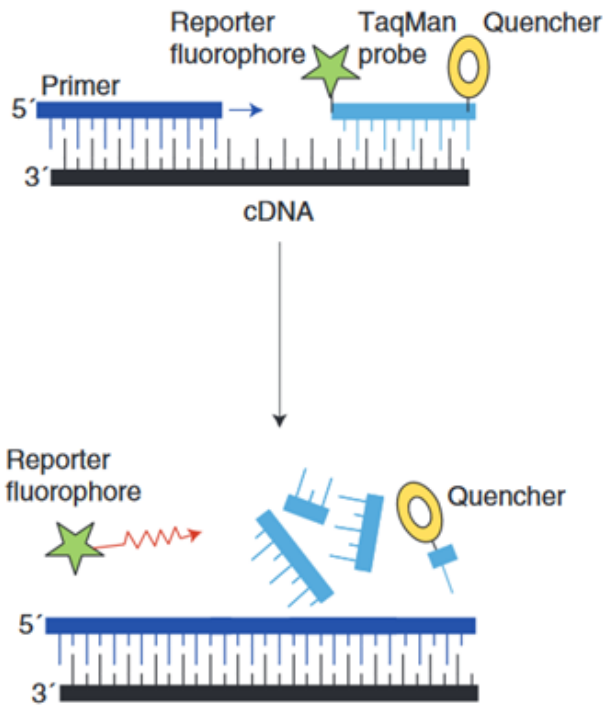


Figure 3.51. Principe de fonctionnement du test TaqMan. L'amorce et le TaqMan intact s'hybrident à la séquence cible après l'étape de dénaturation. Pendant la phase d'extension l'activité 5' endonucléase de la Taq DNA polymérase clive la sonde, séparant le rapporteur de l'extincteur de fluorescence et permet l'augmentation du signal. Adapté de Arya et al.[17].

A travers ces exemples, nous cherchons à mettre en évidence que la détection par fluorescence en volume est possible, mais nécessite des approches relativement élaborées.

3.1.3. Principe de détection avec µLAS

Nous avons rapidement réalisé que la technologie µLAS pouvait servir à lever les verrous liés au bruit de fond en solution. Pour ce faire, nous cherchons à enrichir sélectivement le signal d'une sonde marquée et hybridée à une cible par rapport au bruit de fond de la solution. Cette approche présente plusieurs intérêts : *i)* elle permet d'éviter des étapes d'immobilisations sur surface, *ii)* elle permet d'utiliser des sondes linéaires sans ingénierie particulière.

L'idée sur laquelle repose cette détection est que la formation d'un complexe sonde cible entraine une modification du poids moléculaire des espèces, qui peuvent ensuite être enrichies sélectivement par rapport à la sonde seule. Concrètement, après avoir mélangé des sondes fluorescentes et des cibles complémentaires en solution, nous obtenons un mélange de sondes, de cibles et d'hybrides sondes-cibles de poids moléculaires différents. Il est possible de fixer les

conditions opératoires de µLAS, de manière à arrêter sélectivement les complexes sondes-cibles et laver la sonde en continu (Figure 3.52).

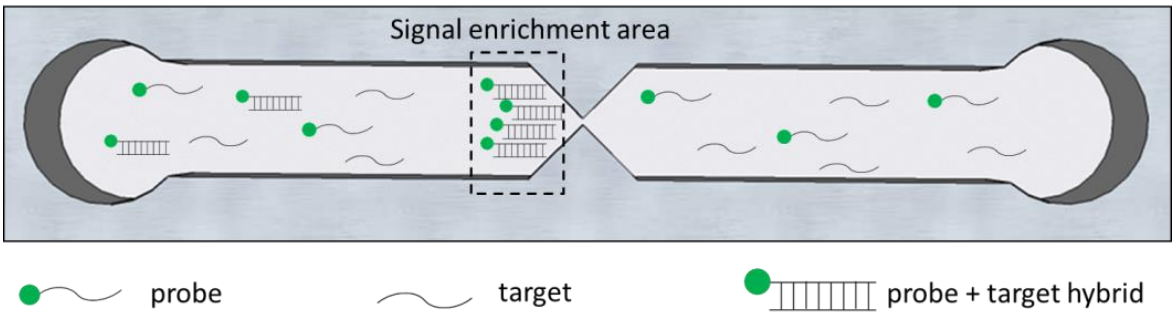


Figure 3.52. Principe d'enrichissement du signal par rapport au bruit de fond de la solution.

En procédant ainsi, on enrichit sélectivement le signal du complexe par rapport au bruit de fond de la solution.

3.2. Les premières preuves de concept

Pour la réussite de cette approche, il est nécessaire que la modification du poids moléculaire lors de l'hybridation soit suffisamment discriminante entre les complexes sondes-cibles et les sondes non hybridées, pour la séparation par µLAS. De plus, il nous a semblé intéressant d'évaluer la compatibilité de µLAS avec la séparation d'ADN en forme simple brin (que peuvent représenter des sondes non hybridées ou des séquences dénaturées).

3.2.1. La séparation de l'ADN simple brin

La démonstration de la séparation d'ADN simple brin a été réalisée par Bayan Chami, au cours de son stage de master 2, effectué dans le cadre de notre projet. De l'ADN simple brin a été obtenu par dénaturation d'un ladder (Low Range DNA ladder, Jena Bioscience) à 1 ng/µL dans le tampon de séparation (TBE 1x, PEG 10 kDa à 20% et YOPRO-1 à 200 nM), en présence d'urée à 7 M. L'échantillon est préalablement chauffé à 95°C pendant 5 min, puis immédiatement refroidi sur glace pendant 3 min. Notons l'absence de DTT pour favoriser la dénaturation et l'utilisation du marquage au YOPRO-1, moins efficace que pour du dsDNA mais tout de même effectif sur du ssDNA. La géométrie de la constriction a été optimisée pour la séparation des fragments de faible poids moléculaire. Plusieurs poids moléculaires et concentrations de PVP ont été testées, mais le PEG (10 kDa) à 20 % en concentration a donné les meilleurs résultats de séparation pour de l'ARN et du ssDNA. Les premiers résultats ont montré la possibilité de séparer des fragments d'ADN simple brins entre 200 et 1000 bases (Figure 3.53).

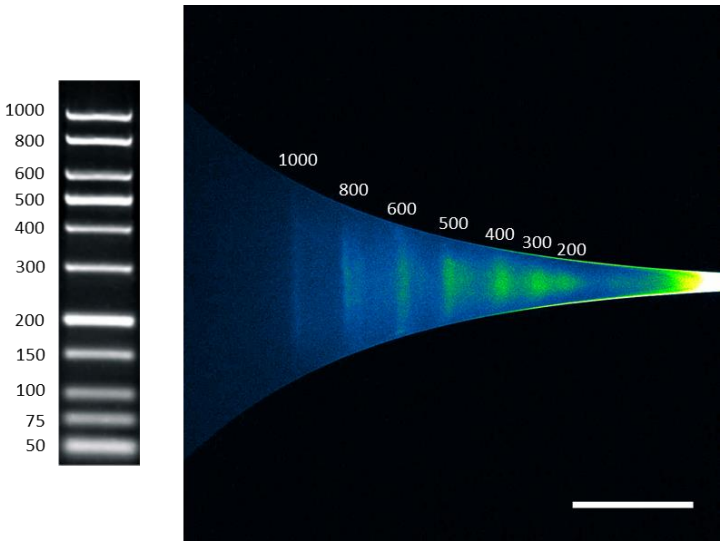


Figure 3.53. Séparation de ssDNA (single stranded DNA) dans une solution de TBE 1x, PEG (10 kDa) à 20 %, YOPRO-1 200 nM. La taille des fragments est donnée en nombre de bases. Les conditions de séparation sont 3 bars et 350 V. L'échelle correspond à 300 µm.

3.2.2. Démonstration de la concentration sélective du complexe sonde-cible

Dans la suite de ce chapitre, le terme de complexe sera utilisé pour faire référence à la sonde hybridée avec la cible. La démonstration de la concentration du complexe séparément des sondes libres est réalisée à l'aide d'une puce à double canaux déjà présentée dans le chapitre 2 (2.2.2.4). Le principe de l'expérience consiste à introduire un mélange de sondes et de cibles dans un canal et uniquement des sondes dans le canal contrôle (Figure 3.54). On cherche alors à montrer que les conditions opératoires permettant la concentration des complexes, diffèrent des conditions pour la concentration des sondes seules[2].

Notons que nous avons obtenu des résultats similaires avec des sondes linéaires et des balises moléculaires. Les séquences cibles utilisées reprennent la séquence du micro ARN 21 (les micros ARN étant une classe d'ARN courts, entre 15 et 25 nucléotides, non codants, et jouant un rôle de régulation dans divers mécanismes cellulaires à travers la dégradation ou la répression des ARNs messagers[19]), car c'est un biomarqueur surexprimé chez les patients atteints de cancer du pancréas[13,19].

Dans l'expérience décrite par la Figure 3.54, 900 nM de sondes de type **balises moléculaires** (32 bases marqué avec une 6-Carboxyfluorescéine et un black hole quencher 1 : *5'-6FAM-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-BHQ1-3'*) sont mélangés ou non avec 300 nM de cibles (22 bases, *5'-*

[2] Un test de l'influence du tampon pour l'arrêt de ces molécules de faibles poids moléculaire a déjà été présenté dans le Chapitre 2 (2.2.3).

TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3') dans une solution de TBE 1x, PVP (40 KDa) à 18%. La solution contrôle sans cible est injectée dans le canal du haut tandis que le mélange est injecté dans le canal du bas.

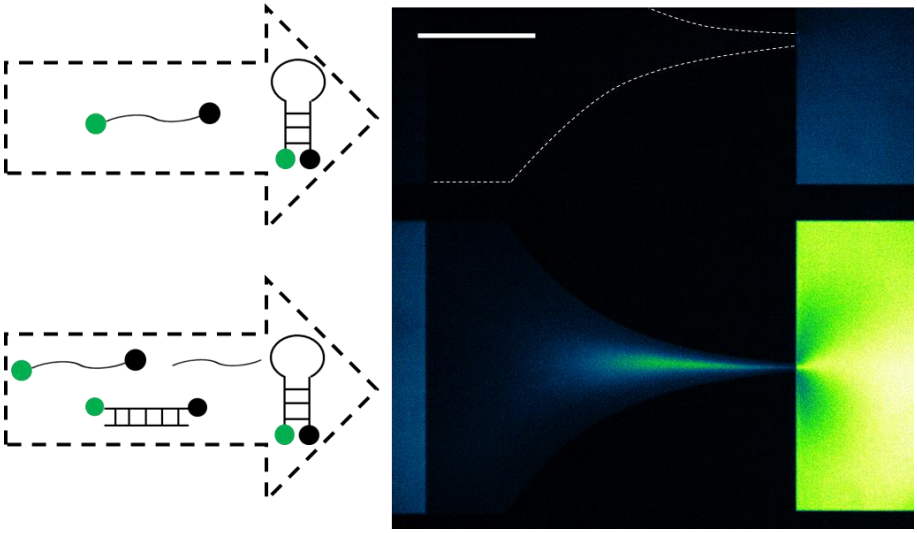


Figure 3.54. Concentration sélective des complexes dans une solution de TBE 1x, PVP (40 KDa) à 18% sous 0,3 bar et 315 V. Les flèches contiennent les espèces injectées dans chaque canal. L'échelle correspond à 300 µm.

Avant tout chose, pour des balises moléculaires, nous remarquons l'absence de bruit de fond dans la partie peu profonde du canal du haut. Ce résultat est attendu dans la mesure où les balises sont en conformation fermées sans cible à détecter. En appliquant des paramètres d'actionnement de 0,3 bar et 315 V (correspondant à une vitesse hydrodynamique de 2,5 cm/s et un champ électrique de 3695 kV/m), dans un canal de 4 µm de hauteur, on observe la concentration sélective des complexes dans le canal du bas tandis que le signal ne change pas dans le canal de contrôle. Nous en concluons que les complexes sont sélectivement concentrés dans ces conditions opératoires. Dans le canal du bas, notons qu'après un certain temps de concentration, nous avons observons une fuite du signal, qui entraine l'augmentation du bruit de fond dans la partie plus profonde, en aval de la constriction.

3.2.3. Concentration du complexe avec différents ratio sondes/cibles

Travailler avec un excès de sondes est intéressant pour la détection car cela permet d'augmenter les probabilités de capture, en particulier lorsque la cible est faiblement présente, mais cela se traduit également par une augmentation du bruit de fond. Cette remarque explique qu'il est

rare de détecter un ratio de plus d'une dizaine de balises par cible en solution[13]. La concentration sélective des complexes par µLAS doit permettre de lever en partie ce verrou.

Nous avons donc voulu détecter un signal pour un ratio de 10 et 100 sondes par cible (Figure 3.55). 100 nM de **sondes linéaires** (22 bases, marqué avec un 6-Carboxyfluorescéine : *5'-6FAM-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'*) est mélangé avec 10 nM (canal du bas) ou 1 nM (canal du haut) de cibles à 92 bases

(5'–AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCTTATCAGACTGATGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'), dans une solution de TBE 1x, PVP (1,3 MDa) à 5%.

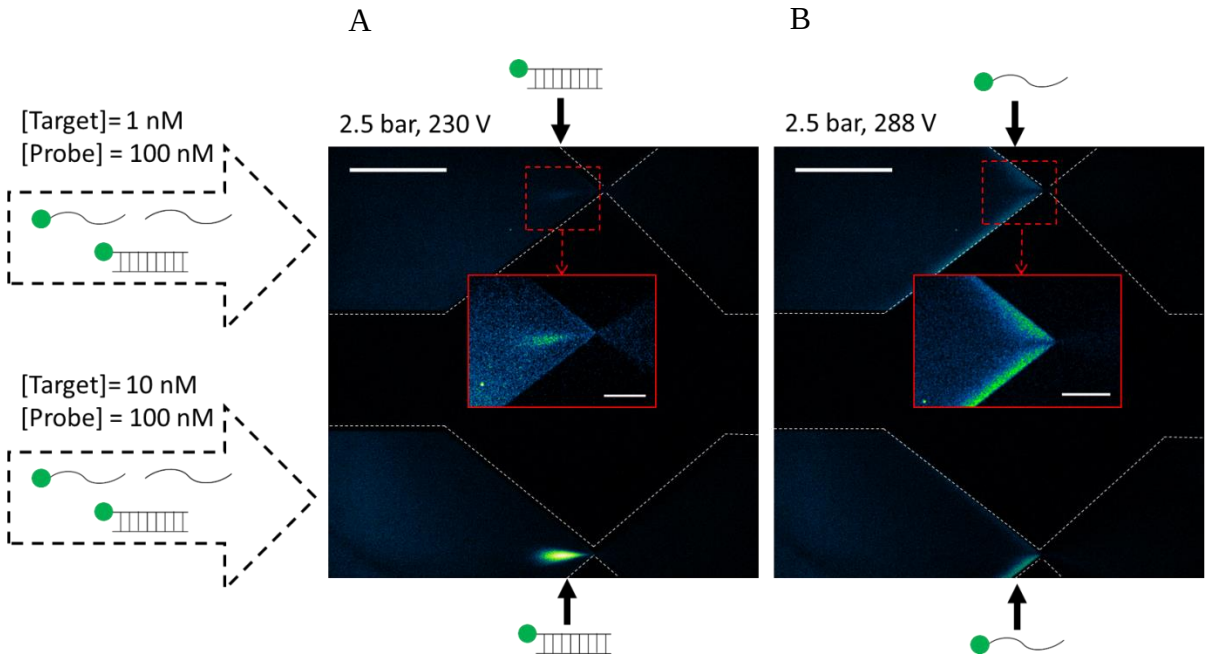


Figure 3.55. Concentration sélective des complexes pour un ratio de sondes en excès. A) Pour 2,5 bar et 230 V, les complexes sont concentrés. B) Pour 2,5 bar et 288 V, les sondes non hybridées sont concentrées. L'échelle correspond à 300 µm. Les inserts encadrés en rouge représentent des zooms de la constriction du canal du haut (échelle 100 µm). Les flèches contiennent les espèces injectées dans chaque canal.

Dans cette expérience, le bruit de fond est le même pour les deux canaux car nous utilisons des sondes linéaires de concentrations identiques. Pour des paramètres opératoires de 2,5 bar et 230 V (correspondant à une vitesse hydrodynamique de 3,0 cm/s et un champ électrique de 19320 kV/m, la hauteur du canal vaut 2µm), on observe la concentration sélective des complexes dans le canal du bas, et une trace dans le canal du haut (Figure 3.55A). La différence d'intensité du signal entre les deux canaux reflète les différences de concentrations en cibles et donc en complexes formés. Pour une même pression, lorsque l'on augmente le champ électrique à 288 V (correspondant à un champ électrique de 24192 kV/m) pour arrêter des molécules de plus faible poids moléculaire,

on observe la concentration des sondes non hybridées par effets de bords (Figure 3.55B). Nous attribuons ce profil de concentration « en moustache » au faible poids moléculaire des sondes (22 bases) qui rendent difficile leur arrêt sans effets de bords. Notons toutefois que l'intensité des « moustaches » est similaire pour les deux canaux et reflète la concentration identique des sondes dans les deux canaux.

Cette expérience nous a permis de démontrer qu'il existe différents régimes pour arrêter les complexes ou les sondes non hybridées et que cette méthode nous permet de travailler jusqu'à un excès de 100 sondes par cible, même avec de simples sondes linéaires.

3.2.4. Les facteurs de concentration

Nous avons enfin cherché à évaluer si la concentration en sonde ou en cible a une influence sur la vitesse de concentration et donc la sensibilité de la détection (Figure 3.56). Nous avons mené une expérience avec les balises moléculaires et les cibles micro ARN 21 décrites dans la partie 3.2.2 de ce chapitre. Nous avons réalisé la concentration sélective pour un mélange de balises et de cibles à 1 µM (Figure 3.56A), et un mélange de balises et de cibles à 1 nM (Figure 3.56B) dans une solution de TBE 1x, PVP (1,3 MDa) à 5%. Les paramètres opératoires sont 2,3 bar et 237 V (correspondant à une vitesse hydrodynamique de 13,1 cm/s et un champ électrique de 15405 kV/m, la hauteur du canal vaut 2 µm).

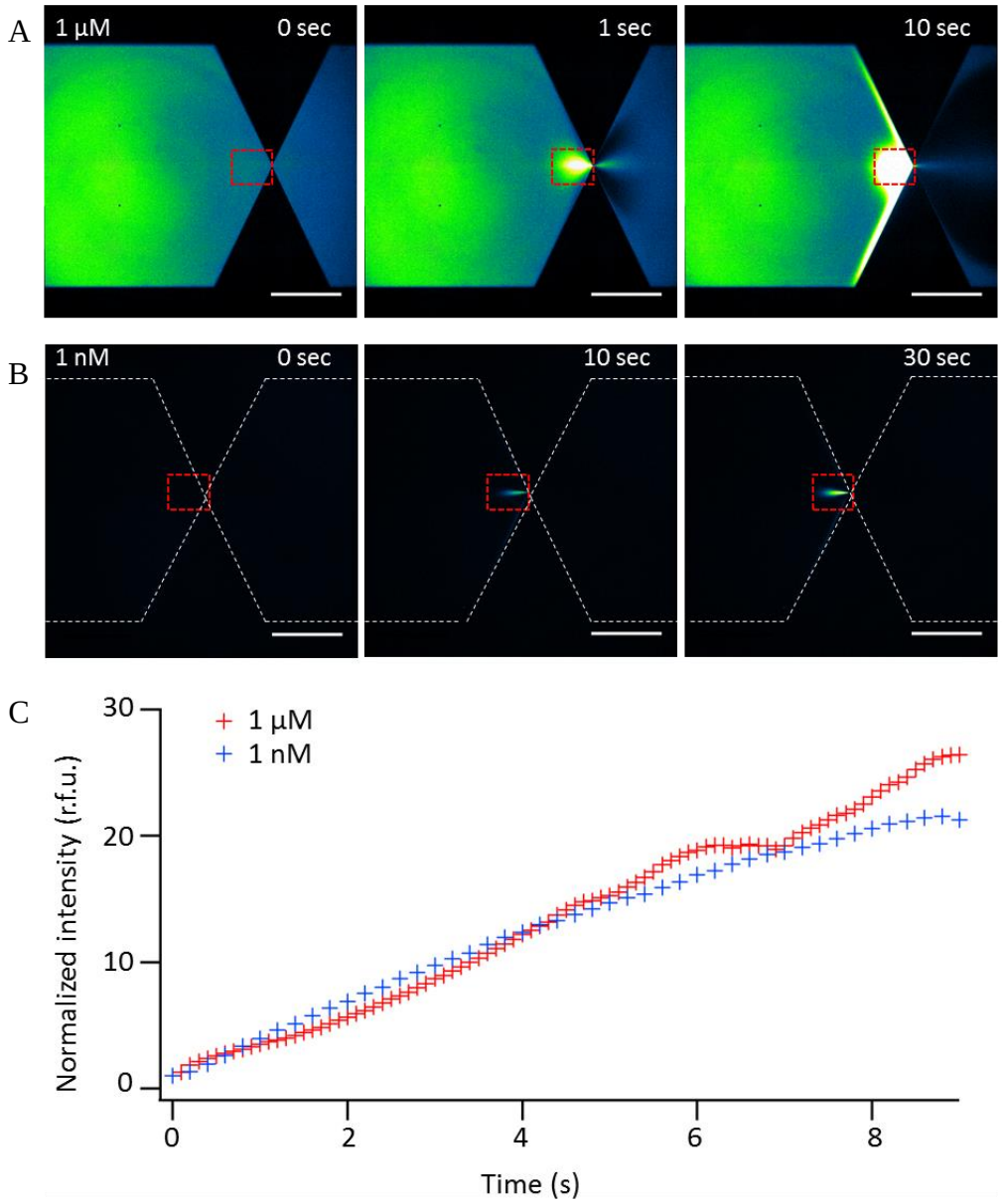


Figure 3.56. Concentration sélective des complexes sondes et cibles. Enregistrement au cours du temps de la concentration pour des concentrations en sondes et cibles de 1 µM (A) et 1 nM (B). Les pointillés rouges représentent la zone d'intégration du signal. L'échelle correspond à 300 µm. C) Tracé de l'intensité du signal dans la région en pointillés rouges au cours du temps.

Pour le mélange à 1 µM, nous obtenons un signal une seconde après le début de la concentration. Après 10 secondes, la majorité des complexes est stoppée en amont de la constriction tandis qu'une zone de déplétion se créé en aval de la constriction. Pour le mélange à 1 nM, un signal plus faible est détectable à partir de 10 secondes de concentration. Les facteurs de concentration sont calculés en intégrant l'intensité de fluorescence à proximité de la constriction (zones en pointillés rouges, Figure 3.56 A et B). Il est intéressant de noter que le tracé du signal au cours du temps a un profil similaire pour les deux concentrations utilisées. Au cours des 9 premières secondes

de concentration, nous obtenons des facteurs d'enrichissement de 160 et 143 par minutes pour des concentrations de 1 µM et 1 nM, respectivement. Ainsi, pour ces gammes de concentration, nous concluons que le facteur d'enrichissement est conservé.

3.2.5. La compatibilité avec de l'ADN extrait de plasma

Nous avons cherché à reproduire la concentration sélective dans un milieu avec un mélange d'ADN. Cette expérience pose les bases de ce que pourrait être le protocole pour la reconnaissance de séquences spécifiques dans le plasma sanguin. Ainsi, l'ADN d'un échantillon plasmatique de 4 mL est extrait (Norgenbiotek Plasma/Serum Circulating DNA Purification Midi Kit), dilué dans notre tampon de séparation TBE 1x, PVP (1.3 MDa) 5% et spiké avec les sondes linéaires (100 nM) et cibles (10 nM ~ 300 ng/mL, confortable pour l'expérience mais supérieures aux concentrations réelles attendues) ou seulement des sondes déjà présentées dans la partie 3.2.3 de ce chapitre. L'échantillon est incubé à 95°C pendant deux minutes pour dénaturer l'ADN et refroidi lentement pour l'hybridation des complexes. L'échantillon de contrôle spiké avec des sondes seulement est injecté dans le canal du haut et l'échantillon spiké avec des sondes et des cibles est injecté dans le canal du bas (Figure 3.57).

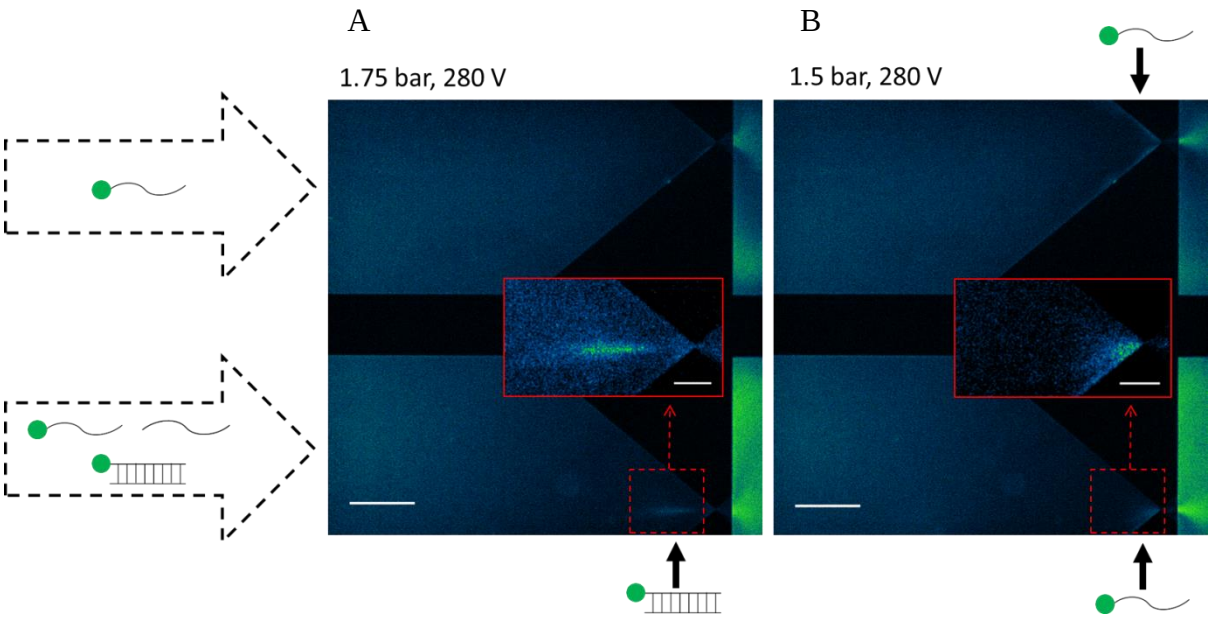


Figure 3.57. Concentration sélective des complexes dans un milieu contenant de l'ADN extrait. A) Pour 1,75 bar et 280 V, les complexes sont concentrés dans le canal du bas uniquement. B) Pour 1,5 bar et 280 V, les sondes non hybridées sont concentrées dans les deux canaux. Les flèches contiennent les espèces injectées dans chaque canal. L'échelle correspond à 100 µm. Les inserts encadrés en rouge représentent des zooms de la constriction du canal du bas (échelle 30 µm).

Pour des paramètres opératoires de 1,75 bar et 280 V (correspondant à une vitesse hydrodynamique de 12 cm/s et un champ électrique de 41160 kV/m), nous observons la concentration sélective des complexes uniquement dans le canal du bas (Figure 3.57A). Pour des paramètres opératoires de 1,5 bar et 280 V (correspondant à une vitesse hydrodynamique de 10,3 cm/s et un champ électrique de 41160 kV/m), nous observons la concentration « en moustaches » des sondes non hybridées dans les deux canaux (Figure 3.57B). Ces résultats, obtenus dans une solution en présence de séquences d'ADN diverses, s'accordent avec nos précédents observations.

Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons montré que µLAS est compatible avec la reconnaissance de séquences spécifiques en solution. Par rapport aux méthodes existantes, la concentration sélective des complexes permet d'améliorer les limites de sensibilité imposées par le bruit de fond de la solution. Par ailleurs, cette méthode est compatible avec de simples sondes linéaires et permet de se placer dans des conditions de sondes en excès pour améliorer les probabilités d'hybridations. Plus généralement, l'association d'une fonction de concentration sélective avec une fonction de détection spécifique représente une alternative aux techniques d'amplification PCR. Ces premiers résultats sont prometteurs mais devront être complétés par d'autres expériences notamment pour démonter le potentiel applicatif pour la détection de séquences circulantes. En effet, il reste à démontrer que cette méthode est suffisamment sensible pour la détection de cibles aux concentrations attendues dans le sang. Pour ce faire, des efforts doivent notamment être menés pour augmenter les volumes d'échantillons analysés par µLAS. Par ailleurs, des études sont à mener pour montrer la spécificité des sondes, notamment vis-à-vis de cibles aux séquences proches.

Considérant le manque de maturité de la fonction de détection spécifique, la suite de ce manuscrit se focalisera sur à la mise en application des fonctions de séparation et concentration de µLAS pour le diagnostic de la maladie de Huntington et l'analyse de l'ADN circulant dans le sang.

Références du chapitre 3

1. Spoto, G. & Corradini, R. *Detection of Non-Amplified Genomic DNA*. (Springer Science & Business Media, 2012).
2. Juskowiak, B. Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential. *Anal. Bioanal. Chem.* **399,** 3157–3176 (2011).
3. Bayani, J. & Squire, J. A. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 22,** Unit 22.4 (2004).
4. Cui, C., Shu, W. & Li, P. Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Front. Cell Dev. Biol.* **4,** (2016).
5. Bumgarner, R. DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Ed. Frederick M Ausubel Al* **0 22,** Unit-22.1. (2013).
6. Hacia, J. G., Brody, L. C. & Collins, F. S. Applications of DNA chips for genomic analysis. *Mol. Psychiatry* **3,** 483–492 (1998).
7. Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **119,** 8916–8920 (1997).
8. Proudnikov, D. & Mirzabekov, A. Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. *Nucleic Acids Res.* **24,** 4535–4542 (1996).
9. Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A. C. & Szallasi, Z. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet. TIG* **22,** 101–109 (2006).
10. Tan, L. *et al.* Molecular beacons for bioanalytical applications. *The Analyst* **130,** 1002 (2005).
11. Marras, S. A. E., Kramer, F. R. & Tyagi, S. Genotyping SNPs With Molecular Beacons. in *Single Nucleotide Polymorphisms* **212,** 111–128 (Humana Press, 2002).
12. Tsourkas, A. Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* **31,** 1319–1330 (2003).

13. Baker, M. B., Bao, G. & Searles, C. D. In vitro quantification of specific microRNA using molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* **40,** e13–e13 (2012).

14. Huang, C. *et al.* Label-free genosensor based on immobilized DNA hairpins on gold surface. *Biosens. Bioelectron.* **26,** 3121–3126 (2011).

15. Du, H., Strohsahl, C. M., Camera, J., Miller, B. L. & Krauss, T. D. Sensitivity and Specificity of Metal Surface-Immobilized 'Molecular Beacon' Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **127,** 7932–7940 (2005).

16. Strohsahl, C. M., Miller, B. L. & Krauss, T. D. Preparation and use of metal surface-immobilized DNA hairpins for the detection of oligonucleotides. *Nat. Protoc.* **2,** 2105–2110 (2007).

17. Arya, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **5,** 209–219 (2005).

18. Buh Gašparič, M., Cankar, K., Žel, J. & Gruden, K. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* **8,** 26 (2008).

19. Gayral, M. *et al.* MicroRNAs as emerging biomarkers and therapeutic targets for pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* **20,** 11199–11209 (2014).

Chapitre 4.

Application au diagnostic de la maladie de Huntington

Analyse de séquences répétées faiblement amplifiées par PCR

Pour valider le potentiel applicatif de µLAS, nous avons cherché un cas pratique nécessitant la mesure de tailles de fragments. Une collaboration a été initiée entre le LAAS et l'équipe de Vincent Dion à l'Université de Lausanne (UNIL) dans le but de mesurer la taille du gène « Huntingtin », qui constitue un marqueur pour le diagnostic de la maladie de Huntington. En effet, le gène de patient présente une amplification anormale de triplets CAG dans la séquence du gène, normalement mesurée par électrophorèse sur gel après amplification moléculaire par PCR. L'équipe de Vincent Dion a été sollicitée pour leur expertise biologique et clinique sur la maladie et ils ont fourni tous les échantillons présentés dans l'étude ci-après.

Le standard d'analyse consiste à mesurer un fragment d'ADN amplifié par PCR dans la gamme 300 à 1500 bp, ce qui correspond a priori parfaitement à la plage analytique de la technologie µLAS. Notre étude s'est toutefois révélée plus délicate que prévue dans la mesure où l'étape d'amplification PCR ne produit pas toujours un seul fragment d'intérêt. En bénéficiant de la sensibilité de µLAS, nous avons travaillé à optimiser le niveau d'amplification, en réduisant le nombre de cycle afin de limiter l'apparition de fragments non spécifiques.

Cette étude est présentée ci-après dans le format d'un article corrigé et resoumis à Nucleic Acids Research *au mois de décembre 2017, après avoir reçu un retour relativement positif des experts. L'article est intitulé « µLAS : Sizing of expanded trinucleotide repeats with femtomolar sensitivity in less than 5 minutes using a microfluidic technology ».*

µLAS: Sizing of expanded trinucleotide repeats with femtomolar sensitivity in less than 5 minutes

Rémi Malbec[1], Lorène Aeschbach[2] , Bayan Chami[1], Gustavo A. Ruiz Buendía[2], Marius Socol[1],Pierre Joseph[1], Thierry Leïchlé[1], Evgeniya Trofimenko[2], Aurélien Bancaud[1,*], and Vincent Dion[2,*]

[1] LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, 31031, France
[2] Center for Integrative Genomics, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Bâtiment Génopode, Lausanne, 1015, Switzerland

* Email: abancaud@laas.fr
Correspondence may also be addressed to vincent.dion@unil.ch

Present Address: [Evgeniya Trofimenko], Department of Physiology, University of Lausanne, Rue du Bugnon 7, Lausanne, 1005, Switzerland

ABSTRACT

We present µLAS, a lab-on-chip system that concentrates, separates, and detects DNA fragments in a single module. µLAS speeds up DNA size analysis down to 5 minutes with a sensitivity of 100 fg μL^{-1}. We aimed at testing its relevance for sizing expanded trinucleotide repeats, which cause over 20 different neurological and neuromuscular disorders. Because the length of trinucleotide repeats correlates with the severity of the diseases, it is crucial to be able to size repeat tract length accurately and efficiently. Expanded trinucleotide repeats are however genetically unstable and difficult to amplify. Thus, the material to work with is often limited, making its analysis labor intensive. Here, we report the detection of heterogeneous allele lengths in patient-derived samples of up to 750 CAG repeats in five minutes or less. This high sensitivity reduces the risk of amplification artefacts without compromising the detection of the expanded allele. These results suggest that µLAS can reduce the rate of false negatives during molecular diagnostic of expanded repeat disorders and speed up routine molecular biology applications.

INTRODUCTION

Microfluidic technologies have a demonstrated potential for processing nucleic acids (1, 2). High efficiency separation of DNA, which is required for a wide variety of applications including sequencing and molecular diagnostics, has, for instance, been achieved by optimizing polymer matrices in capillary electrophoresis (3). High sensitivity detection has been reported with a variety of on-line sample concentration strategies, including electrokinetic stacking with isotachophoresis or field amplification (4), or by integrating a specific module in the workflow based on columns or magnetic particles (5). We recently described a technology that simultaneously separates, enriches, and sizes DNA fragments within minutes (6). It consists in monitoring DNA migration in a viscoelastic fluid using electro-hydrodynamic bi-directional actuation. The shearing of the liquid around the DNA molecules creates transverse viscoelastic forces, oriented towards the channel walls, which increase with the molecular weight (MW) of the DNA fragment, allowing matrix-free separation. Furthermore, when operated in a channel with a funnel geometry, the technology forces similarly-sized fragments to accumulate at the same position in the funnel, thereby concentrating them (6). However, because the device had only one channel, it could not accurately size DNA fragments. We thus designed a novel lab-on-chip system, termed µLAS (µLAboratory for DNA Separation), which is composed of two identical side-by-side channels operated with the same actuation parameters, so as to characterize a sample with respect to a reference DNA ladder in real time. To demonstrate its usefulness, we applied µLAS to the sizing of expanded trinucleotide repeats using minute amounts of DNA, including samples derived from individuals with Huntington's disease (HD) and myotonic dystrophy type 1 (DM1).

On the one hand, HD is caused by the expansion of a CAG/CTG trinucleotide repeat (henceforth we refer to repeat tracts using the non-transcribed strand in the sense orientation) in the first exon of the huntingtin gene (*HTT*) (7). The resulting protein contains an abnormally long polyglutamine tract that makes it toxic, thereby precipitating neurodegeneration through an as yet unclear mechanism (8). On the other hand, DM1 individuals harbor an expanded CTG repeat in the 3' untranslated region on one allele of the Myotonic dystrophy protein kinase (*DMPK*) gene (9–11). The transcript produced is also toxic and affects the processing of RNA transcripts in *trans* (12).

Determining the exact size of the repeat tract is important because it determines in large part the severity of the disease for both HD and DM1 (13, 14). For instance, normal *HTT* alleles have 26 or fewer CAG repeats, whereas HD-causing alleles have 36 or more. Intermediate *HTT* alleles with 27 to 35 CAG repeats are not believed to cause HD, but they are at risk of expanding into the pathological range in the next generation (15, 16). Similarly, DM1 individuals carry one normal allele with less than 37 CTGs and an expanded one of at least 50 CTGs; intermediate allele sizes carry risks for an expansion in the offspring (14, 17). Notably, repeat tracts are dynamic: they change in length at high frequencies in both germlines and somatic tissues. Thus, repeat size determination is critical to understand the causes of expansions and to identify molecular mechanisms for the deliberate contraction of repeat tracts to remove the cause of the disease (17). The main impediments in assaying repeat size is the lack of sensitivity and the labor-intensive nature of current assays (18), which include small-pool PCR (19) and labelled-primer PCR coupled to capillary electrophoresis (20). There is still a need for methods to determine repeat sizes.

Here we wish to test the potential of µLAS for sizing of trinucleotide repeat diseases. We are particularly interested in evaluating whether the sensitivity of our assay would be beneficial to the analysis of target alleles after a minimal number of PCR amplification cycles. For this, we performed a calibration of the technology for DNA fragments in the size range of 100 to 4000 bp. We then established that heterogeneous populations of expanded alleles at the *HTT* and *DMPK* loci containing up to 750 CAGs can be detected in a processing time of five minutes or less, thus covering the entire range of expansions seen in HD and much of that seen in DM1. We report that our assay allows us to decrease the amount of non-specific amplicons without affecting the accurate detection of the expanded allele. Therefore, µLAS speeds up the sizing of expanded trinucleotide repeats by reducing the number of cycles in pre-analytical steps and by drastically shortening the time to result during DNA sizing. µLAS appears to be suitable for a wide array of molecular biology assays, and may have applications in medical genetics.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich, the 100 bp and 1 kb ladder from Ozyme (note that the 100 bp ladder contained 9 bands in 2015, as was used in Fig. 1, and 11 bands since 2016), and fluorophores from Thermofisher. The plasmid pUC19-hph was provided by O. Gadal. The electrophoretic buffer for µLAS anlaysis was composed of 1X Tris-Borate-EDTA (TBE, 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) supplemented with 1.3 MDa Polyvinylpyrrolidone (PVP) and Dithiothreitol (DTT) dissolved at 5% and 2% in weight, respectively, and YOPRO-1 at 100 nM for DNA fluorescent labelling. We inferred the viscosity and relaxation time of the solution to be 35 mPa.s and 30 ms, respectively (manuscript in preparation). Solutions were filtered with 0.22 µm filters. Samples and ladders were diluted into the electrophoretic buffer at typical concentrations of ~100 pg μL^{-1}.

Cell lines and genomic DNA extraction

Patient-derived lymphoblastoid cell lines (LCLs) and DNA samples were obtained from the Coriell biorepository (coriell.org – Table 1). LCLs were grown in RPMI supplemented with 15% fetal bovine serum, 2mM L-GlutaMAX, and penicillin/streptomycin. GFP(CAG)x cells were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin as in (21). Genomic DNA was extracted using the NucleoSpin Tissue kit from Macherey-Nagel according to the manufacturer's protocol.

PCR amplification and DNA templates

The PCR amplification for the HD and GFP(CAG)x samples was done with 5U of MangoTaq DNA polymerase (Bioline) using 100 ng of genomic DNA (equivalently 30,000 allele copies) in the supplied buffer supplemented with 1 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 0.5 µM of each primer, and 3% DMSO. The DM1 samples were amplified with 4U of MyFi Taq (Bioline) with the buffer provided and the same primer concentrations. The PCR program started with an initial step for 5' at 95°C followed by 5 cycles

of 20 s at 95°C, 20 s at 52°C, and 60 s at 72°C. The following 15 to 40 cycles were 30 s at 95°C, 30 s at 55°C, and 90 s at 72°C. A final step of 10 minutes at 72°C was performed. The primers and DNA templates used in this study are found in Supplementary Table S1. The products were analyzed on 1% TAE agarose gels or loaded undiluted onto an Advanced Analytical Technologies Fragment Analyzer and analyzed according to the manufacturer's instructions.

For GM14044, we pooled the product of 96 10 µl-reactions with 100 pg of genomic DNA as a template for each reaction. This was done to avoid amplification biases against longer alleles. We used MangoTaq as above but with the the following PCR program: 95°C for 60 s, then 25 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 270 s followed by 10 minutes at 72°C.

Sanger sequencing was used to confirm all repeat sizes reported except for samples GM14044 and NA05164, which harbored repeat tracts too heterogeneous and too long to be sequenced. For these samples, we performed a small-pool PCR as described in (22) (Supplementary Fig. S1). Briefly, the *HTT* repeat locus was amplified from genomic DNA with primers oVIN-1333 and oVIN-1334 for 30 cycles, with the first 5 cycles having an annealing temperature of 52°C and for the following 25 cycles raised to 55°C. The resulting products were run on a 2% agarose gel. The gel was then transferred on a charged nylon membrane by alkaline transfer and probed for the CAG repeats using a ^{32}P-labeled oligo containing 10 CAG oligonucleotide repeats (oVIN-100). The membrane was exposed to a phosphoscreen and revealed using a Typhoon Scanner. The SP-PCR for the *DMPK* locus in sample NA05164 was done using primers oVIN-1251 and oVIN-1252 and the Ung-based protocol described in a manuscript in preparation.

Chip fabrication and systems integration

The process flow for fabricating the microfluidic chip has been described in (6). Briefly, the channels were obtained by plasma etching of silicon after photolithography. Two steps of etching were carried out over a depth of 16 µm away from the constriction to limit the hydraulic resistance of the microfluidic channel and 2 µm proximal to the constriction. The maximal and minimal channel widths were 800 and 5 µm, respectively. Inlets and outlets were then produced by sand blasting, and silicon was isolated with a layer of 500 nm of thermally-grown oxide. The devices were eventually sealed with a glass wafer by anodic bonding. Two chip designs have been used with linear and power-law shapes for the constriction (Supplementary Table S2); their comparison will be discussed in a manuscript in preparation. Chips were inserted into a peek support and placed on a Zeiss microscope (see (23) for details) equipped with a 10X objective (NA=0.3) and an sCMOS camera with no binning (pixel size=6.5 µm). A pressure controller MFCS (Fluigent) and an electric generator connected to the reservoirs by platinum electrodes were used for actuation. The chips were initially filled with ethanol then rinsed with buffer before loading the DNA ladder and the sample. One chip could be used to process at least five samples.

RESULTS

System design and calibration

When operating µLAS in a single channel system (6), determining MW and concentration was time-consuming because the comparison between a fragment of interest and a MW marker had to be performed sequentially. We overcame this drawback by designing a new microfluidic chip composed of two channels, both operated with the same pressure and electric actuation parameters. This makes side-by-side comparisons possible (Fig. 1A). To perform sizing, we used a viscoelastic liquid composed of 5% (m:vol) polyvinylpyrrolidone supplemented with YOPRO for fluorescence labeling of DNA (see Methods).

We first calibrated this new chip design using three non-repetitive DNA fragments of 466, 798 and 1512 bp, which we produced by PCR amplification of plasmid DNA (see Methods). We fixed the DNA concentration within each band to 80 pg μL^{-1}, which is about three orders of magnitude lower than the typical DNA concentration used for slab gel electrophoresis. We empirically defined the pressure and voltage to be able to visualize all 9 bands of the ladder simultaneously (Fig. 1B-C). The values of these parameters were 6 bar and 82 V, corresponding to a maximum flow velocity and an electric field of ~7.1 cm s^{-1} and 6888 kV m^{-1}, respectively (Supplementary Table S2). We recorded videos of DNA accumulation (Supplementary video 1), and systematically took the micrograph acquired after 30 s for image processing. We extracted the intensity profile along the symmetry axis of the two funnels (blue and red arrows in Fig. 1B) and used linear interpolation between the ladder bands to determine the size of the three target bands. We estimated the size of these three bands to be 456, 788 and 1550 bp, showing that the difference in DNA length between the readout and the nominal size was less than 3%, *i.e.,* an accuracy of ~10 bp for a fragment of 350 bp.

We used the same procedure to calibrate higher MW DNA samples. The ladder had 6 bands from 0.5 to 4 kb, the sample was composed of two fragments of 1091 and 3314 bp, which we obtained by restriction of pUC19 hph (Fig. 1D-E). The flow and electric fields were reduced by factors of six and two, respectively, to resolve the 6 bands of the ladder. We determined the size of the two target bands to be 1089 and 3417 bp, and concluded that the difference between the readout and the nominal size was 3% within a range of 100 bp to 4 kb. Notably, the analysis of the ladder allowed us to compute the resolution length, as defined by the size difference between two bands divided by the separation resolution (24). The resolution length corresponds to the minimal size between two consecutive peaks that can be separated in one single channel. We found that this value varied between 50 and 75 bp in the range of 200-1000 bp (Supplementary Fig. S2A), implying that sizing experiments could not be carried out with a ladder in a single channel due to risks of overlap. This justified the use of a dual channel chip to achieve a precision of 3%.

We further tested the reproducibility of µLAS for single band analysis by running the same ladder in the two channels and by comparing the position of their 6 bands (Supplementary Fig. S2B). The difference was less than 2 µm for fragments of 400- 1000 bp. This result was confirmed by running four consecutive rounds of analysis with the same sample (Supplementary Fig. S2C), because we determined that the standard error of position measurements was ~2-3 µm for bands in the range 500

to 1500 bp. Given that the physical distance between the bands of 400 and 500 bp bands was 80 µm, we deduced that the error in localization typically accounted for uncertainties in sizing of 2+2 µm times 100 bp divided by 80 µm, or about ~5 bp. Taken together, our results argue that µLAS is robust and accurate.

To determine the accuracy of the concentration measurements of each DNA fragment derived by PCR, we compared the total intensity of each band to that of their nearest neighbor in the ladder. As a reference, we used the DNA concentration assessed by absorbance spectroscopy before on-chip analysis. We found that the error on the concentration measurements was 30% (Supplementary Fig. S3).

Finally, we evaluated the lower limit of detectable DNA concentration after 5 minutes of concentrating and separating fragments with the 100 bp ladder at a total concentration of 1 pg μL^{-1}, or ~100 fg μL^{-1} per band. We observed a build-up in intensity for all bands of the ladder within 5 minutes (Fig. 2). Notably, given that the flow rate was 0.09 µL min^{-1} (Supplementary table S2), our analysis after five minutes was carried out with a volume of ~0.5 µL and each band contained ~50 fg. The Fragment Analyzer, a high-sensitivity equipment for nucleic acid detection, has a lower limit of detection of about ~5 pg μL^{-1} with a processed volume of 20 µL, according to the manufacturer. The sensitivity of µLAS was therefore 50-fold and 2,000-fold greater in concentration and mass, respectively.

Overall, µLAS allowed us to estimate DNA MW and concentration within 5 minutes with an accuracy of 97% and 70%, respectively, for fragments between 100 bp and 4000 bp with a sensitivity of ~100 fg μL^{-1}.

Using µLAS to measure the size of expanded CAG repeats

Our results prompted us to apply µLAS to situations in which determining exact fragment sizes using minute amounts of DNA is relevant. Thus, to test whether we could size expanded CAG-containing sequences, we amplified a repeat tract from a single copy GFP transgene integrated in HEK293-derived cell lines (GFP(CAG)x, where x is the number of repeats harbored by the transgene) (21). We obtained amplicons from GFP(CAG)x cells carrying 15, 50, 101, and 270 CAGs with expected amplicon sizes of 672, 777, 930 and 1437 bp, respectively, as determined by Sanger sequencing. We limited the PCR amplification to 25 cycles to reduce the possibility of non-specific amplification (see below). Analysis of the reaction product with a Fragment Analyzer showed that longer repeat sizes were more heterogeneous, as expected (Supplementary Fig. S4A). To obtain enough material to be able to visualize the fragment with 270 CAGs by agarose gel electrophoresis, we pooled the product of three PCRs (Fig. 3A), which emphasizes both the difficulty in obtaining large quantities of DNA from these sequences and the enhanced sensitivity of µLAS. We estimated the fragment sizes to be 675, 782, 920 and 1410 bp, implying that the error in sizing was 0.4, 0.6, 1.1, and 1.9 %, respectively (Fig. 3B). In all cases, therefore, we obtained bands of the expected sizes in one

single analysis with the four samples pooled together using conditions that allow each band to be well resolved. Thus, µLAS accurately determined the CAG repeat size in all four samples.

Characterization of PCR products of the *HTT* locus

To determine whether we could apply µLAS to more complex clinically-relevant samples, we next monitored the repeat size at the *HTT* gene in genomic DNA isolated from a lymphoblastoid cell line derived from a HD patient (GM3620). This individual bore one allele with 18 CAGs, the other with 60 repeats, according to Sanger sequencing. Using primers flanking the repeat tract (and including the polymorphic CGG repeat abutting the CAG repeat (25)), we expected the amplification of fragments measuring 455 and 581 bp, respectively. To test for the sensitivity of the assay, we sized the repeat tracts in amplicons after 20, 25, 35, and 45 cycles of amplification, for which the total DNA concentration was 3.5, 5.7, 72, and 104 ng μL^{-1}, respectively, as inferred from absorbance spectroscopy. The concentration of each sample was then set to 35 pg μL^{-1} for µLAS analysis, meaning that they were diluted at least 100 fold and the total concentration of the ladder was set to 400 pg μL^{-1}, or ~40 pg μL^{-1} per band. This concentration range allowed us to characterize each sample within one minute (Fig. 4A-F). After 20 or 25 cycles of PCR, two bands of 478 and 584 bp were consistently detected (Fig. 4B-D), corresponding with the expected PCR products. After 20 cycles of amplification, we noted the accumulation of residues with lower MWs, which did not appear as a band but rather as a smear. After 35 cycles of PCR, two additional bands of 397 and 434 bp were observed (Fig. 4E and Table 2) and an additional 735 bp band appeared after 45 rounds of amplification (Supplementary Fig. S5). In contrast, sample analysis by agarose gel electrophoresis after 45 cycles only revealed two bands at ~480 and 610 bp (Fig. 5A), probably because of insufficient sensitivity and/or the inability to resolve bands of similar MW. Note that we confirmed their presence using the Fragment Analyzer, which revealed the presence of two peaks at 20 cycles and the accumulation of non-specific bands after 45 cycles (Supplementary Fig. S4B). These extra bands may be non-specific by-products or heteroduplexes with hybrids of the two alleles.

We also assessed the amplification factor for each band by measuring the increase in the concentration of the amplicons with the number of cycles. We calculated this factor to be maximal between 20 and 25 cycles for the HD alleles with about two copies of DNA produced per cycle (lower line in Table 2). In contrast, we observed a decrease in the amplification efficiency down to 1.05 copies per cycle between 35 and 45 cycles, probably due to the competitive formation of the extra bands as well as the consumption of the primers and dNTPs. From these results, we concluded that to maintain high levels of accuracy and, at the same time, eliminate the production of potentially non-specific amplicons, the determination of the repeat size of the *HTT* locus should be carried out with 25 cycles of amplification and with single band concentrations of ~400 pg μL^{-1}.

Analysis of patient-derived samples

Next we asked how widely applicable our method is by performing more detailed analyses on patient-derived samples. Specifically, we determined CAG repeat lengths in three more HD patient samples and an unaffected individual, covering the whole range of repeat size seen in HD. The

shorter alleles contained 15 to 19 repeats, corresponding to amplicons in the range of 446 to 458 bp whereas the larger alleles presented 30, 46, 48, 60 and 750 repeats (Table 1). These corresponded to size differences between the two alleles of 45, 84, 99, 126 and 2193 bp, respectively. The samples were collected after 25 cycles of PCR at a typical concentration of ~1 ng μL^{-1}. They were diluted by a factor of ~100 into the separation buffer, and a 100 bp ladder was prepared at 15 pg μL^{-1}. They were processed on chip during 30 to 50 s (Fig. 5). For four of the five samples, we could detect two alleles with lengths consistent with the prediction based on Sanger sequencing and agarose gel electrophoresis after 45 cycles of amplification (Table 2 and Fig. 5A). The concentration of these fragments of 400 to 600 bp was in the range of 50 to 600 pg μL^{-1}, in agreement with our measurements at different stages of the PCR amplification (Table 2).

For sample GM14044, which contains the longest and most heterogeneous expanded allele averaging ~750 CAG repeats (Supplementary Fig. S1), we could only detect the shorter allele using these initial conditions (Fig. 5F). We therefore switched to higher MW analysis with the kb ladder as reference, and detected two bands of ~500 and 1850 bp (Fig. 6A). The size of the high MW band is somewhat smaller than the expected length of 2193 bp. By contrast, we used the only other method to detect such small amounts of DNA, Fragment Analyzer, and found a size of 1120 bp (Supplementary Figure S4). This was somewhat expected because expanded CAG/CTG repeats run anomalously fast through acrylamide-based matrices like one used by the Fragment Analyzer (26). Although µLAS appears to underestimate the allele length for very long repeats, we note that the width of this high MW band was 2.5 times larger than that of the 2 kb fragment of the ladder, indicating the occurrence of genomic instability for this expanded allele, as seen with the SP-PCR (supplementary Fig. S1A). We conclude that µLAS allows the detection of expanded repeat tracts covering the whole range of sizes seen in HD.

Furthermore, we applied our technology to a DM1-derived sample. A single band of 1052 bp was detected for the sample from an unaffected individual (GM04604) (Fig. 6B, gray columns of table 2), in good agreement with the expected size of 1051 bp for two alleles of 5 CTGs. The expanded allele from the DM1 individual (NA05164) was determined to be 377 CTG repeats by conventional diagnostic methods (27). Surprisingly, we found by SP-PCR that this sample contained a large number of contractions in addition to some alleles corresponding to the expected size (Supplementary Fig. S1B). Consistently, a one-minute analysis with µLAS analysis revealed four bands with the normal allele of 1144 bp, two higher MW bands of 1714 and 2816 bp, corresponding with the expected allele sizes based on SP-PCR and a low MW band of less than 500 bp that was poorly resolved with the actuation settings we used (Fig. 6C). The concentration of the band of 2816 bp was four- and twelve-times lower in comparison to that of 1714 and 1144 bp, respectively. These results suggest that µLAS is applicable to a wide variety of samples and allele-length heterogeneity contents.

DISCUSSION

In this study, we designed a new microfluidic system that enables the separation, concentration, and sizing of DNA fragments within minutes using miniscule amounts of material. We expect this to be advantageous for routine molecular biology work, as it would save time usually spent during agarose gel electrophoresis. Moreover, we show that because of the high sensitivity of the assay, we could use shorter PCR programs and thus reduce the risk of amplification artifacts. We further demonstrate that µLAS can accurately determine the size of expanded repeats as large as 377 CAG/CTG triplets and detect heterogeneous alleles from patient-derived samples with an average repeat size of up to 750 CAGs. Our results cover the entire range of expansions seen in HD, and they suggest that µLAS may improve the molecular diagnostics. Indeed, genetic testing of both HD and DM1 is currently slow and false negatives in which the expanded allele remains undetected are a worry. This common problem to the molecular diagnostic of many expanded microsatellite repeat diseases and is due to issues of sensitivity whereby low amounts of a heterogeneous DNA sample are poorly detected. In addition, repeat size heterogeneity is not taken into account during molecular diagnostic even though it is thought to modify disease severity (18). µLAS gives more information about repeat instability than current diagnostic methods. Indeed, the width of the largest HD alleles analyzed (GM14044) was larger than the ladder band of a similar length, which could be explained by instability. Moreover, the results obtained from the DM1 sample (NA05164) using µLAS reflected the instability seen by SP-PCR. With more work of certification for molecular diagnostic applications, we thus suggest that the sensitivity, speed, and the added instability data of µLAS may help avoid false negatives as well as provide more diagnostic information.

Given the sensitivity of µLAS, we suggest that non-PCR-based approaches may be compatible with our microfluidic method. For example, it may be possible to use *in vitro* CRISPR-Cas9 digestion (28) of genomic DNA to release a single DNA fragment corresponding to a locus of interest and then separate, concentrate, and size it without the need for PCR amplification. Because this approach does not rely on PCR amplification with serial cycles but only on the sensitivity of µLAS, artifacts related to DNA synthesis may no longer a problem. Therefore, this approach, which obviously requires minimal off-target DNA restriction by Cas9, would perform the equivalent of a Southern blot but on a microfluidic chip, within minutes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Y. Trottier and F. Hamaratoglu for critical reading of the manuscript as well as O. Gadal for reagents.

FUNDING

This work was partly supported by the LAAS-CNRS micro and nano-technologies platform, member of the French RENATECH network. R. M. and B. C. PhD fellowships are supported by an Institut Carnot grant and “Ligue contre le cancer”, respectively. This project was partly supported by the project

“Gene Extractor” from Région Midi-Pyrénées. The Dion lab is supported by a SNSF professorship (#144789), a grant cofounded and by the Gebert Rüf Stiftung and UNISCIENTIA STIFTUNG within the programme «Rare Diseases – New Approaches» (GRS-060/14), and an iPhD grant from SystemsX.ch.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Liu,P. and Mathies,R.A. (2009) Integrated microfluidic systems for high-performance genetic analysis. *Trends Biotechnol.*, **27**, 572–581.

2. Paegel,B.M., Blazej,R.G. and Mathies,R.A. (2003) Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 42–50.

3. Albarghouthi,M.N. and Barron,A.E. (2000) Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **21**, 4096–4111.

4. Simpson,S.L., Quirino,J.P. and Terabe,S. (2008) On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. *J. Chromatogr. A*, **1184**, 504–541.

5. Pamme,N. (2006) Magnetism and microfluidics. *Lab. Chip*, **6**, 24–38.

6. Ranchon,H., Malbec,R., Picot,V., Boutonnet,A., Terrapanich,P., Joseph,P., Leïchlé,T. and Bancaud,A. (2016) DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids. *Lab Chip*, **16**, 1243–1253.

7. MacDonald,M.E., Ambrose,C.M., Duyao,M.P., Myers,R.H., Lin,C., Srinidhi,L., Barnes,G., Taylor,S.A., James,M., Groot,N., *et al.* (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**, 971–983.

8. Labbadia,J. and Morimoto,R.I. (2013) Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 378–385.

9. Brook,J.D., McCurrach,M.E., Harley,H.G., Buckler,A.J., Church,D., Aburatani,H., Hunter,K., Stanton,V.P., Thirion,J.P. and Hudson,T. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, **68**, 799–808.

10. Mahadevan,M., Tsilfidis,C., Sabourin,L., Shutler,G., Amemiya,C., Jansen,G., Neville,C., Narang,M., Barceló,J. and O'Hoy,K. (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*, **255**, 1253–1255.

11. Fu,Y.H., Pizzuti,A., Fenwick,R.G., King,J., Rajnarayan,S., Dunne,P.W., Dubel,J., Nasser,G.A., Ashizawa,T. and de Jong,P. (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, **255**, 1256–1258.

12. Thornton,C.A., Wang,E. and Carrell,E.M. (2017) Myotonic dystrophy: approach to therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **44**, 135–140.

13. Holmans,P.A., Massey,T.H. and Jones,L. (2017) Genetic modifiers of Mendelian disease: Huntington's disease and the trinucleotide repeat disorders. *Hum. Mol. Genet.*, **26**, R83–R90.

14. Yum,K., Wang,E.T. and Kalsotra,A. (2017) Myotonic dystrophy: disease repeat range, penetrance, age of onset, and relationship between repeat size and phenotypes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **44**, 30–37.

15. Kremer,B., Goldberg,P., Andrew,S.E., Theilmann,J., Telenius,H., Zeisler,J., Squitieri,F., Lin,B., Bassett,A., Almqvist,E., *et al.* (1994) A Worldwide Study of the Huntington's Disease Mutation: The Sensitivity and Specificity of Measuring CAG Repeats. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1401–1406.

16. Brinkman,R.R., Mezei,M.M., Theilmann,J., Almqvist,E. and Hayden,M.R. (1997) The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 1202–1210.

17. López Castel,A., Cleary,J.D. and Pearson,C.E. (2010) Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 165–170.

18. Dion,V. (2014) Tissue specificity in DNA repair: lessons from trinucleotide repeat instability. *Trends Genet. TIG*, **30**, 220–229.

19. Monckton,D.G., Wong,L.J., Ashizawa,T. and Caskey,C.T. (1995) Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1–8.

20. Mangiarini,L., Sathasivam,K., Seller,M., Cozens,B., Harper,A., Hetherington,C., Lawton,M., Trottier,Y., Lehrach,H., Davies,S.W., *et al.* (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, **87**, 493–506.

21. Cinesi,C., Aeschbach,L., Yang,B. and Dion,V. (2016) Contracting CAG/CTG repeats using the CRISPR-Cas9 nickase. *Nat. Commun.*, **7**, 13272.

22. Dion,V., Lin,Y., Hubert,L., Waterland,R.A. and Wilson,J.H. (2008) Dnmt1 Deficiency Promotes CAG Repeat Expansion in the Mouse Germline. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1306–1317.

23. Viero,Y., He,Q. and Bancaud,A. (2011) Hydrodynamic Manipulation of DNA in Nanopost Arrays: Unhooking Dynamics and Size Separation. *Small*, **7**, 3508–3518.

24. Yamaguchi,Y., Li,Z., Zhu,X., Liu,C., Zhang,D. and Dou,X. (2015) Polyethylene Oxide (PEO) and Polyethylene Glycol (PEG) Polymer Sieving Matrix for RNA Capillary Electrophoresis. *PloS One*, **10**, e0123406.

25. Bastepe,M. and Xin,W. (2015) Huntington Disease: Molecular Diagnostics Approach. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, **87**, 9.26.1-23.

26. Chastain,P.D., Eichler,E.E., Kang,S., Nelson,D.L., Levene,S.D. and Sinden,R.R. (1995) Anomalous rapid electrophoretic mobility of DNA containing triplet repeats associated with human disease genes. *Biochemistry (Mosc.)*, **34**, 16125–16131.

27. Kalman,L., Tarleton,J., Hitch,M., Hegde,M., Hjelm,N., Berry-Kravis,E., Zhou,L., Hilbert,J.E., Luebbe,E.A., Moxley,R.T., *et al.* (2013) Development of a Genomic DNA Reference Material Panel for Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) Genetic Testing. *J. Mol. Diagn. JMD*, **15**, 518–525.

28. Jinek,M., Chylinski,K., Fonfara,I., Hauer,M., Doudna,J.A. and Charpentier,E. (2012) A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, **337**, 816–821.

TABLE AND FIGURES LEGENDS

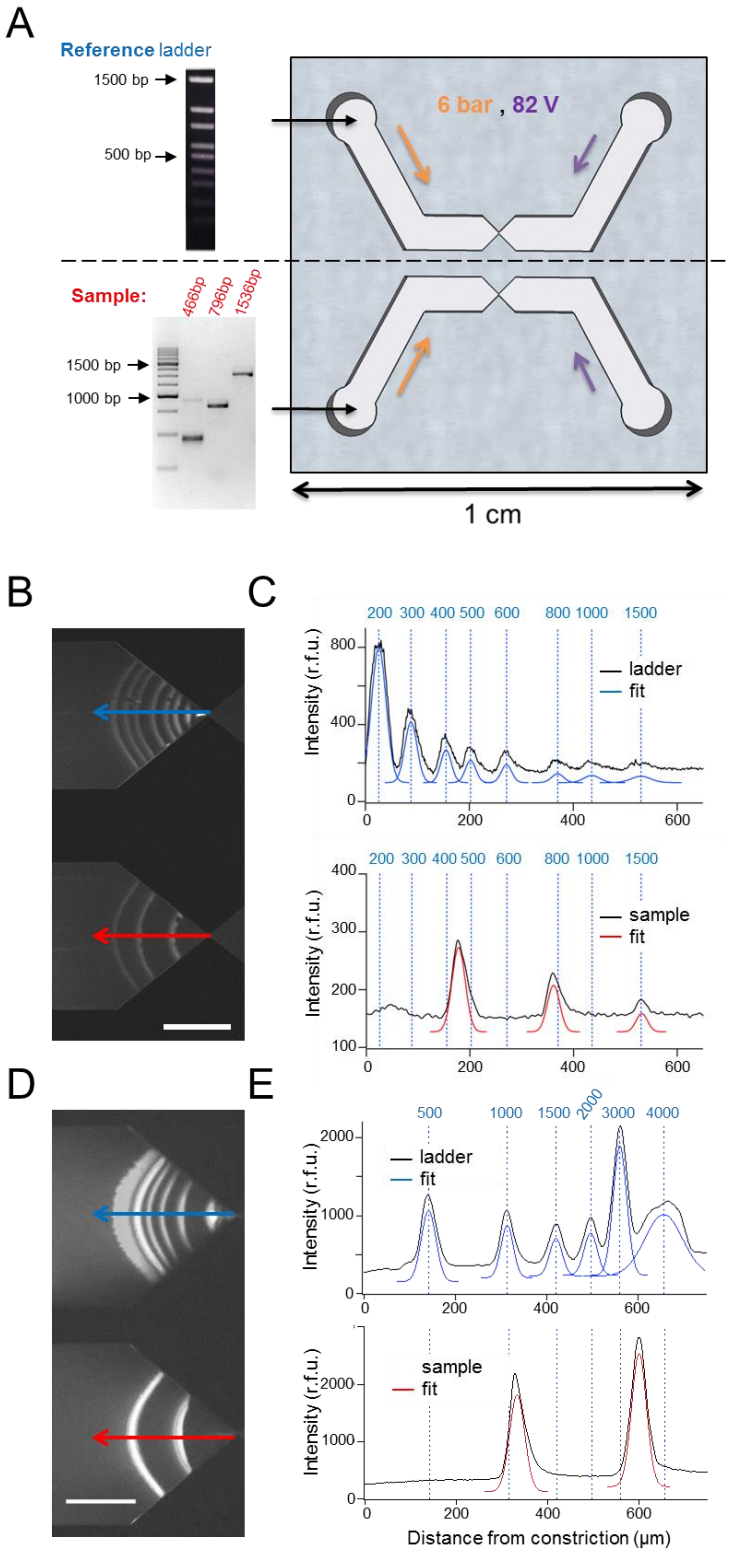


Figure 1. Microfluidic chip for DNA separation and size identification. (A) µLAS chip with two independent channels actuated with the same pressure and voltage. Each channel contains one funnel that functions to separate and concentrate DNA in line. We used a reference signal with a DNA ladder in the upper channel and conveyed the analyte in the bottom channel. During calibration, we analyzed amplicons from non-repetitive sequences originating from plasmid DNA (45 cycles of PCR).

The 1% TAE agarose gel shown was loaded with 500 ng of DNA per well. (B) A fluorescence micrograph showing the two channels after concentration and separation during 30 s using a target sample with three fragments of 466, 798 and 1512 bp at 80 pg μL^{-1}. Actuation parameters are set to 6 bar and 82 V, corresponding to maximal flow velocity and electric field of ~7.1 cm s^{-1} and 6888 kV m^{-1}, respectively. (C) The two plots represent the intensity profile along the two arrows represented in panel (B). The raw data is in black and the corresponding fits with Gaussian functions in blue and red. Based on the position of the center of each Gaussian peak in the ladder (top), we assign the size of the three bands in the sample by linear interpolation. (D) The same experiment as in panel (B) with 6 bands of a kb ladder, and 2 bands of 1091 and 3314 bp diluted a concentration of 100 pg μL^{-1}. Actuation parameters are set to 1 bar and 50 V. (E) The two plots correspond to the fluorescence intensity distribution along the symmetry line of the two channels with the corresponding Gaussian fits. The scale bars correspond to 300 µm in (B) and 400 µm in (D).

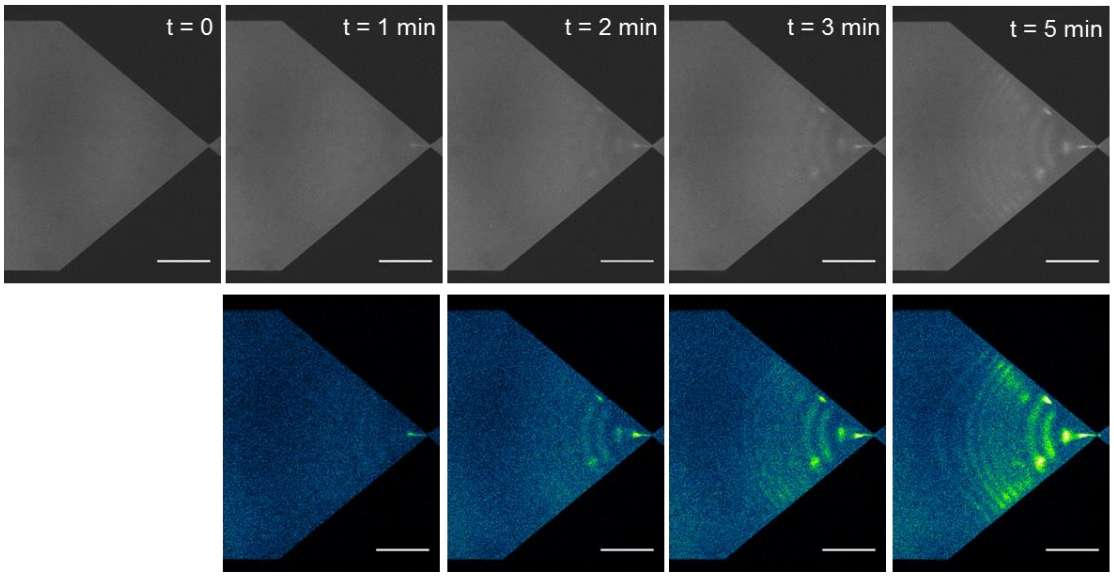


Figure 2. Detection of DNA ladder fragments at 100 fg µL^{-1}. The time series in the upper panel shows fluorescence intensity at the constriction using a 100 bp DNA ladder diluted at 1 pg µL^{-1}. Actuation parameters are the same as in Fig. 1B. Taking the fluorescence micrograph at t=0 s as a reference, the lower panel represents background subtracted intensity profiles, in which the presence of the 9 bands of the ladder appear after 5 minutes (see Fig. 1A). The scale bars correspond to 300 µm.

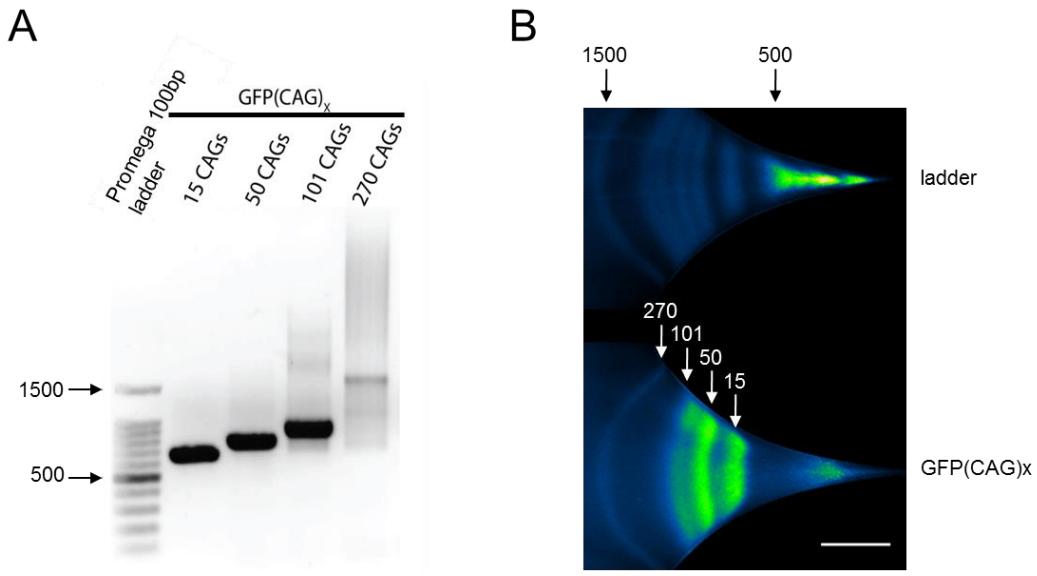


Figure 3. Measuring CAG repeat expansions in GFP(CAG)$_x$ cell lines. (A) Four samples containing 15 to 270 CAGs after 35 PCR cycles run on a 1% TAE agarose gel. The samples are pools of three reactions. (B) The four samples amplified using 25 PCR cycles were mixed together and processed during 30 s in our microfluidic platform. The scale bar corresponds to 300 µm.

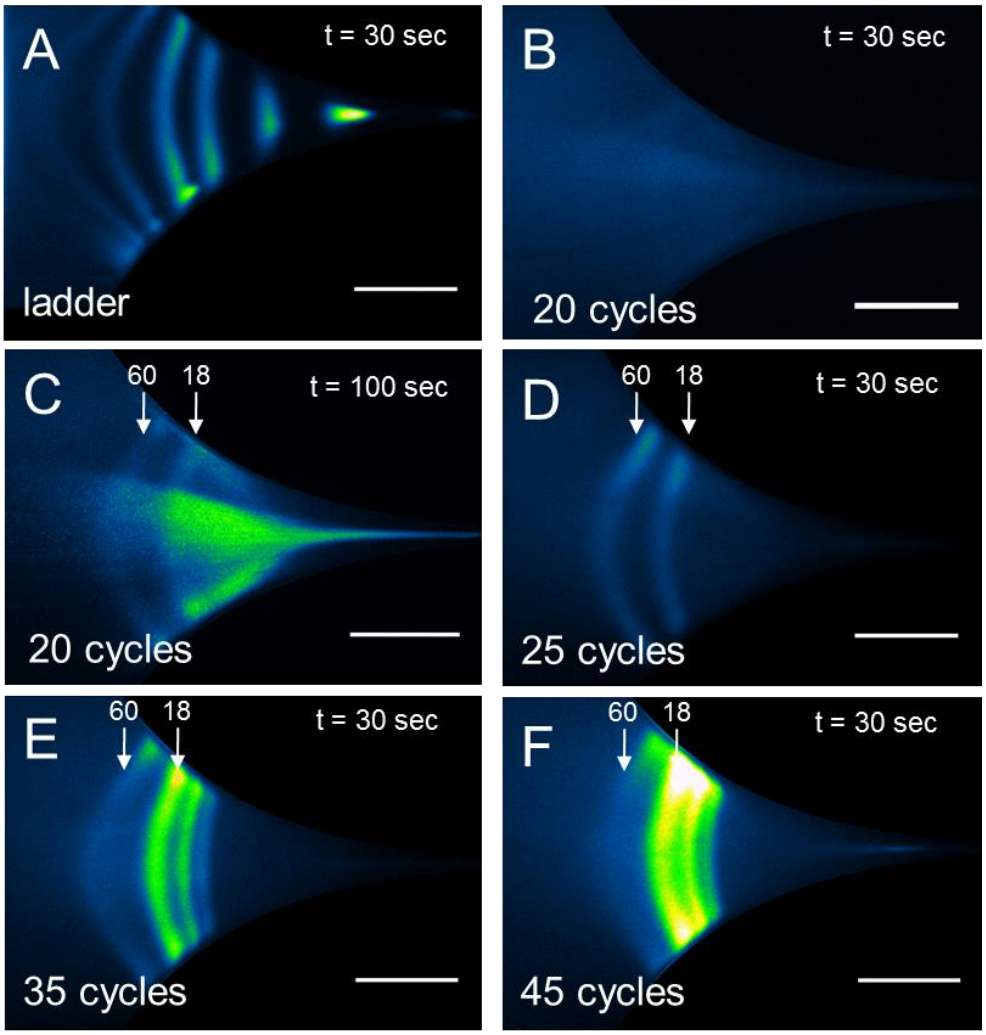


Figure 4. Analysis of PCR amplification from genomic DNA of a patient with 18 and 60 CAG repeats. Amplicons obtained after 20, 25, 35, and 45 PCR cycles are conveyed in the microfluidic channel using a constriction with a parabolic profile and actuation parameters of 2 bar and 130V, corresponding to ~5.7 cm s^{-1} and 1525 kV m^{-1} for the maximum flow velocity and electric field, respectively. Each panel shows the fluorescence micrographs. The corresponding intensity profiles along the symmetry line of the channel are shown in Supplementary Fig. S6. (A) 100 bp MW ladder after 30 s of concentration. (B) 20 cycles of PCR after 30 s of concentration. (C) 20 cycles of PCR after 100 s of concentration. (D) 25 cycles of PCR after 30 s of concentration. (E) 35 cycles of PCR after 30 s of enrichment. (F) 45 cycles of PCR after 30 s of enrichment. The vertical blue lines in the plots in Supplementary Fig. S6 are the positions of the bands of the ladder, as inferred from Gaussian fitting of the data in (A). The scale bars correspond to 200 µm.

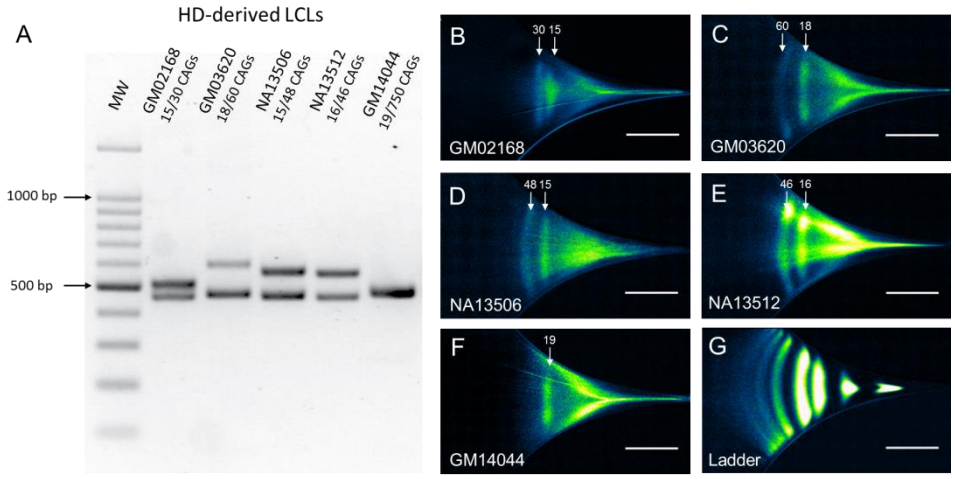


Figure 5. Analysis of HD patient-derived samples after 25 cycles of PCR. (A) 1% TAE agarose gel electrophoresis of patient-derived amplicons (45 cycles, 500 ng loaded). (B-G) The fluorescence micrographs represent the PCR products conveyed in the chip at 2 bar and 160 V, *i.e.* maximum hydrodynamic and electric fields of ~5.7 cm s^{-1} and 1877 kV m^{-1}, respectively, and enriched during 100 s. The plots obtained from the intensity distribution along the channel symmetry axis are shown in Supplementary Fig. S7. The ladder concentration was set to 15 pg μL^{-1} (panel (G)). The scale bars correspond to 300 µm.

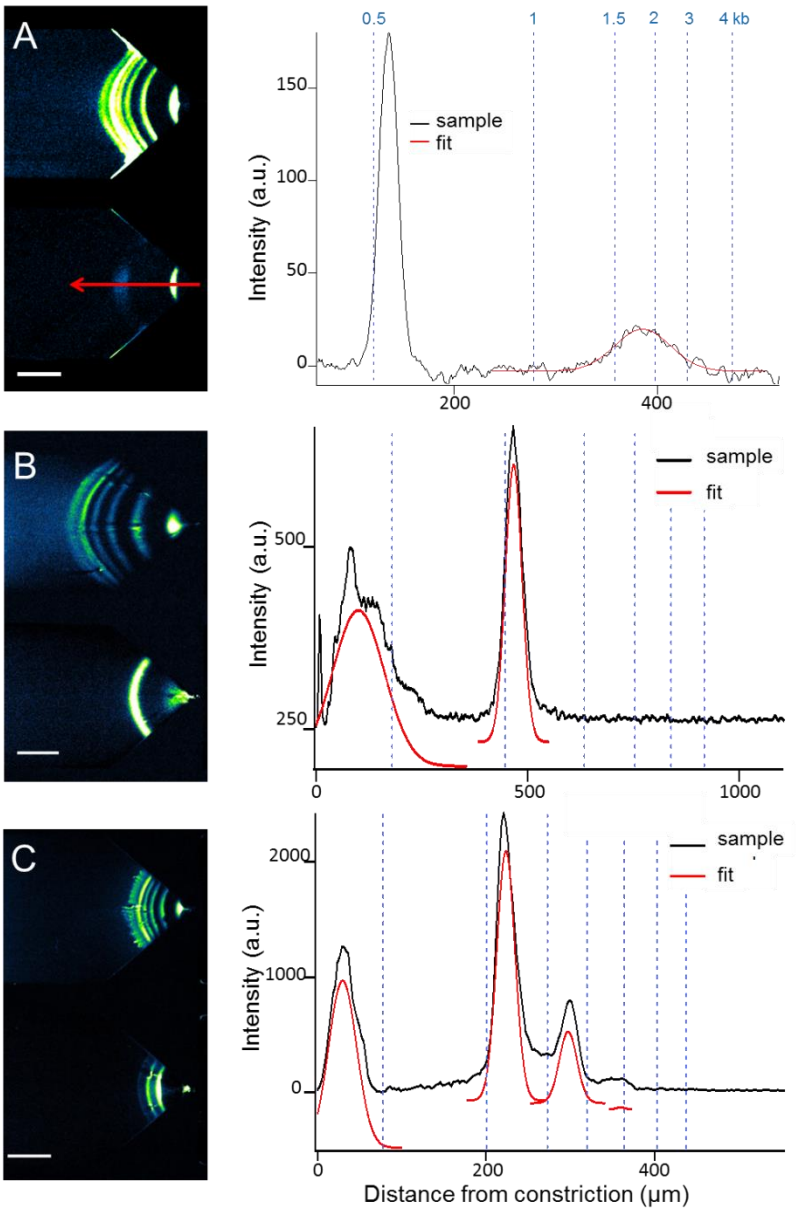


Figure 6. Analysis of GM14044 HD sample and MD samples with kb ladder reference. (A) The fluorescence micrograph represents the GM14044 PCR products conveyed in the chip at 1 bar and 66 V, *i.e.* maximum hydrodynamic and electric fields of ~1.2 cm s^{-1} and 5540 kV m^{-1}, respectively, and enriched during 100 s (Note that the micrograph with a lower tension of 20 V, i.e. with a brighter high MW band but a poor a size resolution, is shown in Supplementary Fig. S7G). The intensity profile along the symmetry axis of the channel in plotted in the right. (B) Analysis of the *DMPK* locus of an unaffected individual (GM4604) with the µLAS fluorescence micrograph and the corresponding intensity profile. Actuation parameters are ~1 cm s^{-1} and 4700 kV m^{-1}. (C) Same as in (B) with the DM1-derived sample (NA05164) with actuation parameters are ~1 cm s^{-1} and 3100 kV m^{-1}. The scale bars correspond to 300 µm.

Table 1. Sizes and concentration of HD and DM1 patient samples after 25 cycles of PCR. The size of the bands, the corresponding number of CAG/CTG repeats, and their concentration are deduced from the data presented in Figure 5 and 6. DM1 samples are shaded in grey.

Sample	NA13506		NA13512		GM03620		GM14044		GM02168		GM4604	NA05164		
Allele size (bp)	446	545	449	539	455	581	458	2193	446	491	1051	1099	2167	-
Measured size (bp)	443 +/- 13	544 +/- 16	473 +/- 14	562 +/- 17	477 +/- 14	608 +/- 18	458 +/- 14	1850 +/- 55	467 +/- 14	520 +/- 16	1052 +/- 32	1144 +/- 34	1714 +/- 34	2816 +/- 34
Expected number of CAG/CTG repeats	15	48	16	46	18	60	19	750	15	30	5	21	377	-
Measured number of CAG/CTG repeats	14	48	24	54	25	70	19	636	22	40	5	31	221	594
Evaluated concentration (ng/µL)	0.05	0.05	0.2	0.3	0.4	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	0.5	0.4	0.1	0.03

Table 2. Size and concentration of GM03620 *HTT* PCR products. The position of the bands in the sample and their concentration before dilution for on-chip analysis are deduced from the data presented in Figure 3. Non-specific bands are highlighted with a gray background. The high MW band only detected after 45 cycles is deduced from the fluorescence micrograph shown in Supplementary Fig. S6. The last line presents the enrichment factor inferred from the concentration ratio between consecutive cycles of the PCR amplification.

# of cycles	20		25		35				45				
Amplicon	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Unspe 1	Unspe 2	Allele 1	Allele 2	Unspe 1	Unspe 2	Allele 1	Allele 2	Unspe 3
Fragment size (bp)	485 +/- 15	595 +/- 18	478 +/- 14	584 +/- 18	397 +/- 12	434 +/- 13	485 +/- 15	596 +/- 18	399 +/- 12	430 +/- 13	480 +/- 14	575 +/- 17	735 +/- 22
Concentration (ng/µL)	0.1 +/- 0.02	0.06 +/- 0.01	3.2 +/- 0.5	5.0 +/- 1.5	38 +/- 6	117 +/- 18	251 +/- 38	136 +/- 20	117 +/- 18	338 +/- 51	506 +/- 76	233 +/- 35	5.4 +/- 3
Enrichment factor			32	83			65	21	3.4	2.8	2.5	1.9	

Supplementary Material

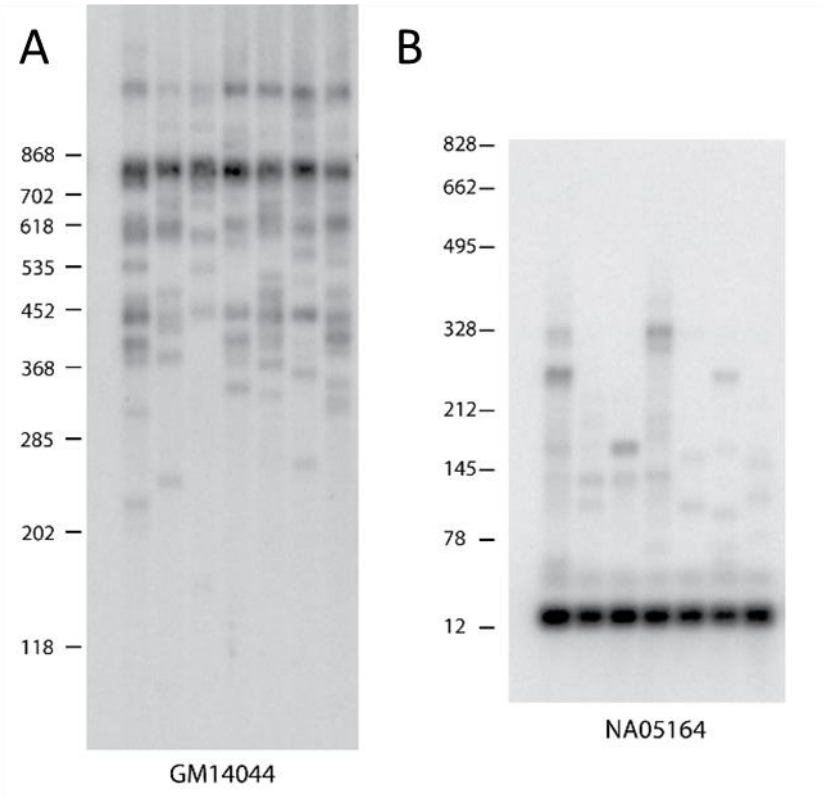
µLAS: Sizing of expanded trinucleotide repeats with femtomolar sensitivity in less than 5 minutes

Rémi Malbec[1], Lorène Aeschbach[2] , Bayan Chami[1], Gustavo A. Ruiz Buendía[2], Marius Socol[1],Pierre Joseph[1], Thierry Leïchlé[1], Evgeniya Trofimenko[2*],Aurélien Bancaud[1], and Vincent Dion[2]

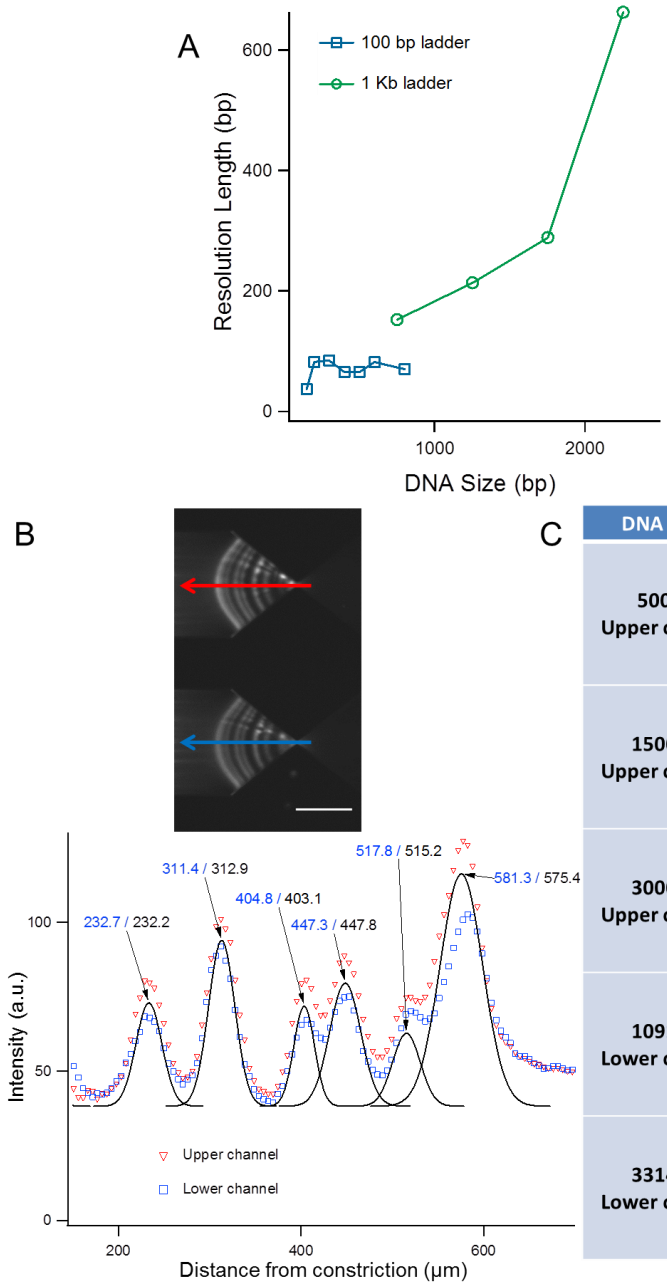
[1] LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

[2] Center for Integrative Genomics, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Bâtiment Génopode, 1015 Lausanne, Switzerland

* current address: Department of Physiology, University of Lausanne, Rue du Bugnon 7, 1005 Lausanne



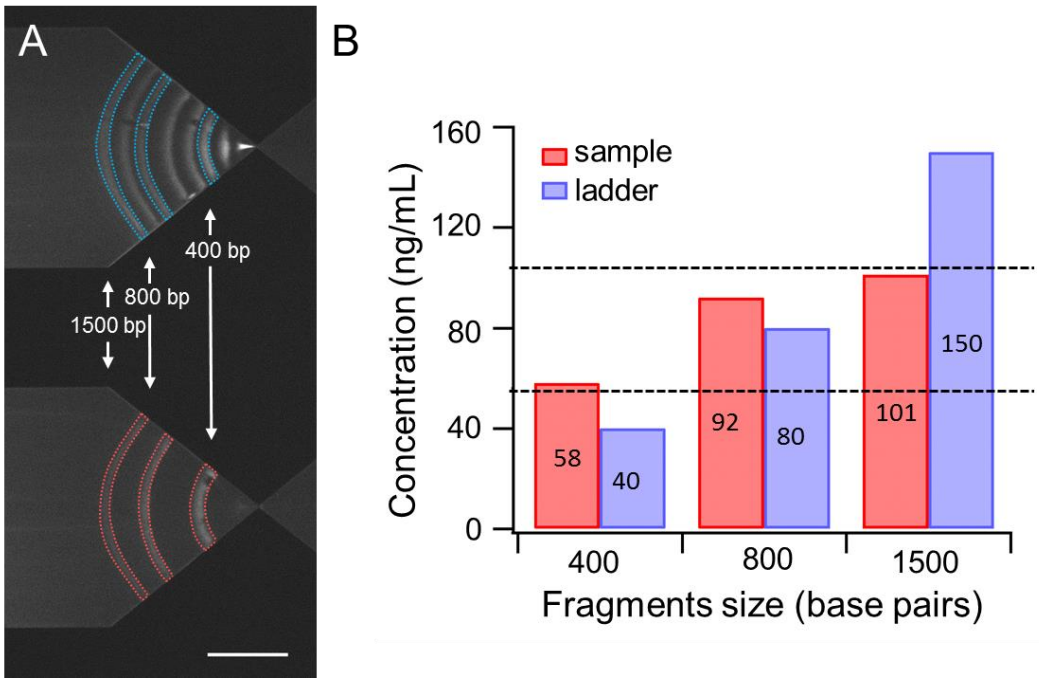
Supplementary figure S1. SP-PCR analysis. We confirmed the presence of the expanded CAG repeats of samples GM14044 **(A)** and NA05164 **(B),** their average sizes, and the instability. The numbers on the left indicate the size of the repeat tract expected for a given fragment size.



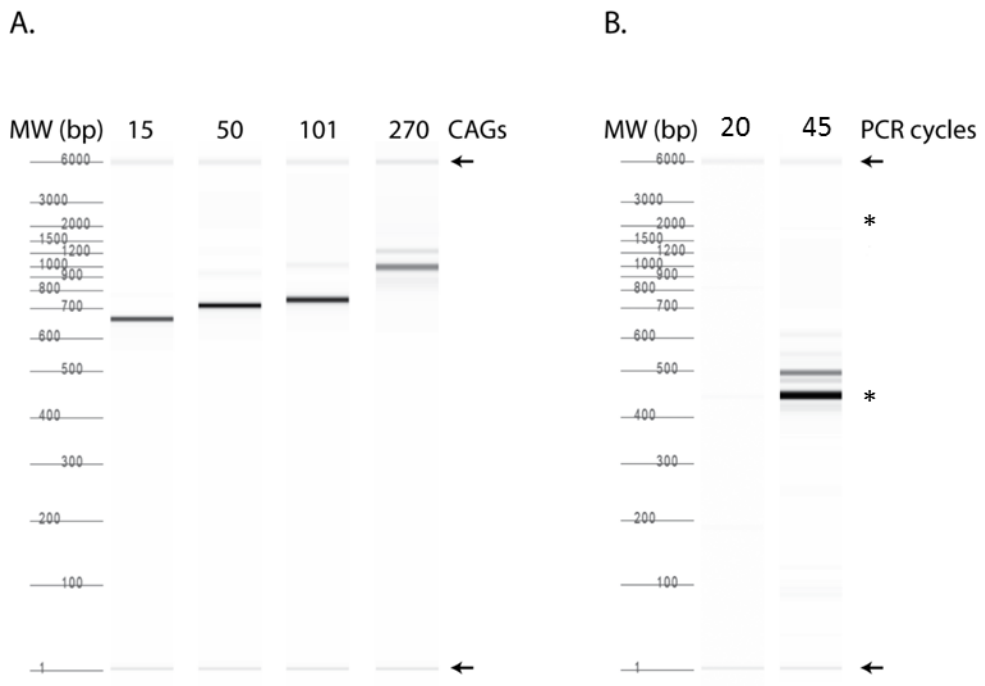
C

DNA band	Position (µm)	σ_{pos}
500 bp Upper channel	143.644	2.00
	145.154	
	145.853	
	141.327	
1500 bp Upper channel	436.585	2.59
	438.105	
	435.749	
	432.001	
3000 bp Upper channel	582.186	4.04
	574.908	
	572.866	
	575.502	
1091 bp Lower channel	336.403	2.99
	337.236	
	333.321	
	330.695	
3314 bp Lower channel	610.006	3.18
	603.31	
	610.086	
	607.27	

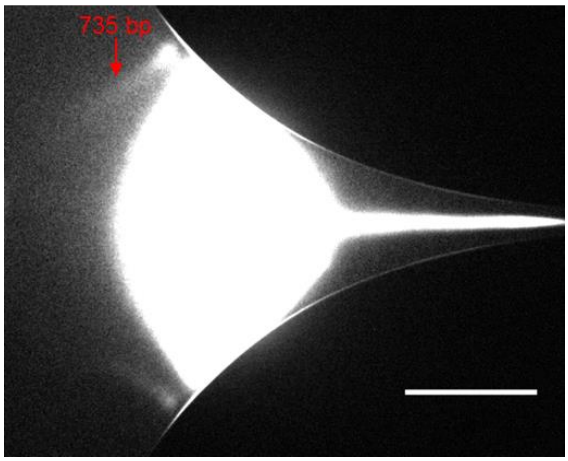
Supplementary figure S2. Reproducibility of µLAS technology. (A) The plot represents the resolution length as a function of DNA size, as determined by measuring the resolution between the different bands of the two DNA ladders. (**B**) The fluorescence micrograph shows the two channels after enrichment and separation during 30 seconds with the 100 bp ladder diluted at 500 ng μL^{-1}. Actuation parameters are set to 6 bars and 100 V. The scale bar corresponds to 300 µm. The graph at the bottom shows the intensity distribution along the symmetry lines of each channel. Each peak is fitted with a Gaussian function to extract its position, which is indicated with a tag. (**C**) Separation and concentration was also carried out in a two-channel system multiple times, and the positions of 3 peaks in the ladder or two peaks in the sample were systematically measured. For these 5 peaks, we determined the standard deviation for each measurement.



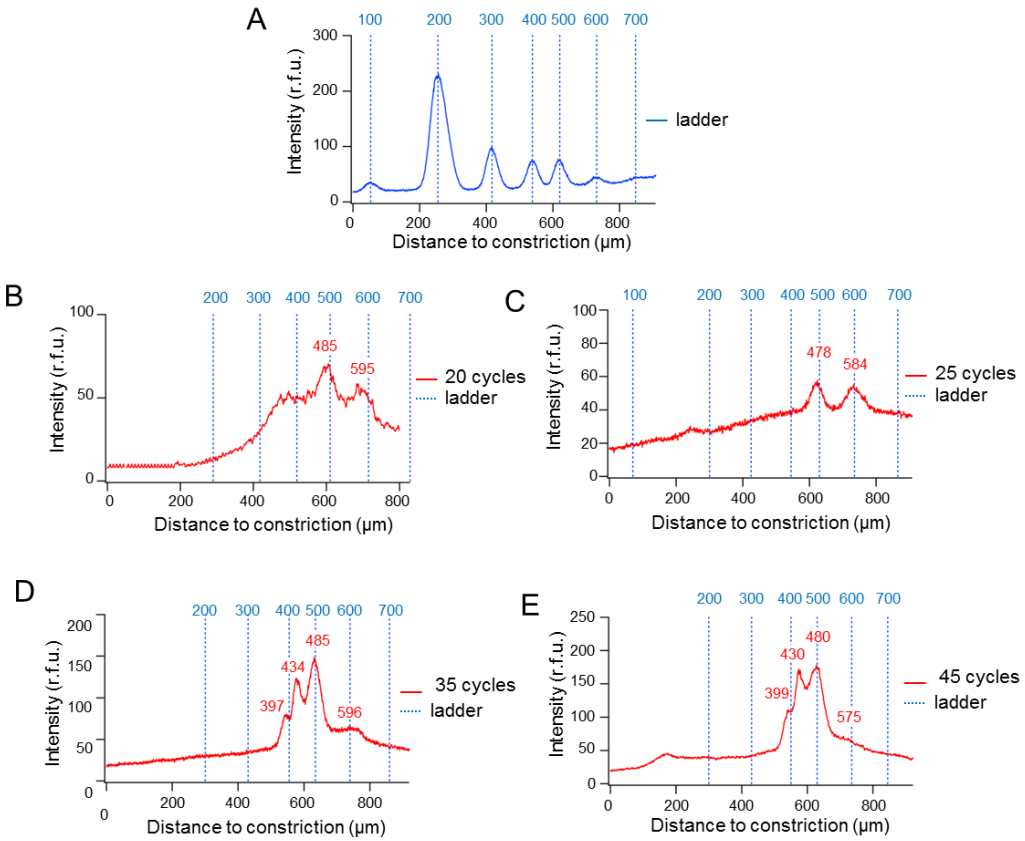
Supplementary figure S3. Determination of the bands concentration by comparison of their intensity with respect to the ladder reference. (A) The fluorescence micrograph shows the dual channel chip with the sample (bottom) and the ladder (top). The concentration of the three bands of the sample is 80 pg μL^{-1}, and the bands of the ladder of 400, 800 and 1500 bp are diluted at concentrations of 40, 80 and 150 pg μL^{-1}, respectively. The scale bar corresponds to 300 µm. **(B)** Fluorescence intensity is integrated in the 6 ROI of the image shown in (A) in order to estimate the amount of DNA in each band. Provided that we know the concentration of the reference bands in the ladder, fluorescence intensity ratio enable us to infer the concentration of the target bands of 58, 92, and 101 pg μL^{-1}, as reported in the plot. The concentration is measured with an error of +/- 30% around the expected concentration of 80 pg μL^{-1}



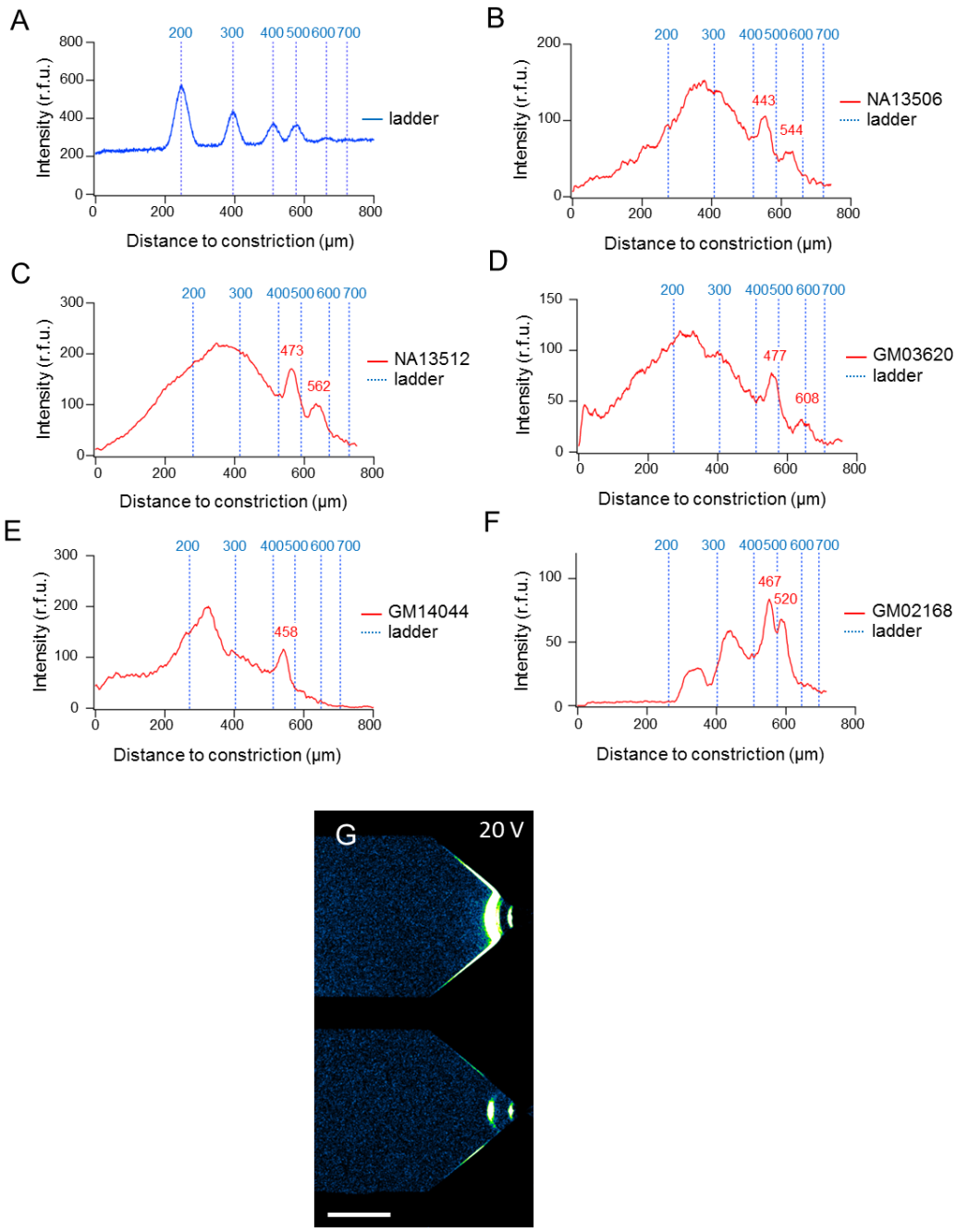
Supplementary Fig. S4. PCR amplicons characterized with the Fragment analyzer. (A) Amplicons of a transgene with repeat sizes ranging from 15 to 270 CAGs in GFP(CAG)x previously characterized by Sanger sequencing (21). The minor bands are most likely the result of repeat instability. **(B)** PCR amplicons of GM14044 after 20 and 45 cycles of PCR. Note that the sample at 45 cycles was diluted three times before being loaded onto the fragment analyzer. The stars represent the size of the expected PCR products. In both panels, the arrows are the spiked in length markers at 1 and 6000 bp. On the 20 cycle PCR, the Fragment Analyzer software detected a band at 443 bp and two peaks at 819 and 1119 bp.



Supplementary figure S5. Fluorescence micrograph of the sample GM03620 after 45 cycles of PCR using 100 s of µLAS enrichment at 2 bar and 130 V. These actuation parameters correspond to ~5.7 cm s^{-1} and 1525 kV m^{-1} for the maximum flow velocity and electric field, respectively. The low intensity band in the left of the figure corresponds to a band of 735 bp. Note that the kinetics of concentration of high MW DNA bands is slower than that of low MW fragments, accounting for the bright signal ahead in the constriction (6). The scale bar corresponds to 200 µm.



Supplementary figure S6. Plots from the intensity distribution along the channel symmetry axis for sample GM03620 after different number of amplification cycles and corresponding to micrographs in Fig. 4. Analysis of PCR products in the time course of the reaction. **(A)** Plot of the reference channel filled with ladder. **(B-E)** Sample after 20, 25, 35 and 45 cycles of PCR respectively.

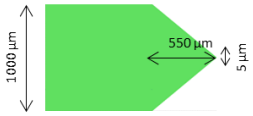
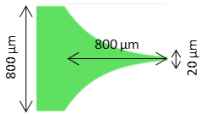


Supplementary figure S7. Plots from the intensity distribution along the channel symmetry axis for different patients' samples and corresponding to the micrographs in Fig. 5. Analysis of patients' samples after 25 cycles of PCR. **(A)** Plot of the reference channel filled with ladder. **(B-F)** Sample NA13506, NA13512, GM03620, GM14044 and GM02168 respectively. (G) The fluorescence micrograph represents the GM14044 PCR products conveyed in the chip at 1 bar and 20 V, *i.e.* maximum hydrodynamic and electric fields of ~1.2 cm s^{-1} and 1700 kV m^{-1}, respectively, and enriched during 100 s.

Supplementary table S1. Primers used in this study.

Name	Sequence	Target	Expected size	Reference
oVIN-0100	5'CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	Probe for SP-PCR	-	(29)
oVIN-1333	5'CCGCTCAGGTTCTGCTTTTA	HTT	401bp + $(CAG)_n$	This study
oVIN-1334	5'CAGGCTGCAGGGTTACCG			
oVIN-1425	5'GACCTCATACGAAGATAGGCTT	GFP insert in GFP$(CAG)_X$ cell lines.	627bp + $(CAG)_n$	This study and ref. (21)
oVIN-0460	5'TCTGCAAATTCAGTGATGC			
oVIN-0273	5'ATT TTG CCG ATT TCG GCC TAT	pGEM-t-easy	466bp	Primers: This study, plasmid: Promega
oVIN-0811	5'TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGA CGAAACACCGGATCATTGGAAAACGTTCTT			
oVIN-0961	5'CTGCAGGTCGACCATAGTGACT	pLenti CMV Puro DEST – 796bp fragment	796bp	Primers: This study, plasmid: Ref. (30)
oVIN-0597	5'GCCTTGGGAAAAGCGCCTCC			
oVIN-0124	5'CGCCGCATACACTATTCTCA	pGEM-t-easy	1536bp	This study
oVIN-0600	5'GGCGCTCTTCCGCTTCCTCG			
oVIN-1251	5' GAGCGTGGGTCTCCGCCCAG	DMPK (SP-PCR)	265 bp + $(CTG)_n$	This study
oVIN-1252	5' CACTTTGCGAACCAACGATA			
oVIN-1252	5' CACTTTGCGAACCAACGATA	DMPK (analysis on chip)	1036 bp + $(CTG)_n$	This study
oVIN-1320	5' ATAACCTCCCCAACCTCGAT			

Supplementary table S2. Expressions of the flow rate, flow velocity and electric field along the symmetry axis of the channel for the two designs used in the study. The comparison of these designs will be compared quantitatively in a manuscript in preparation. With ΔP in bar, l in µm, η in cP and V in V.

ConstrictionGeometry		
Flow rate (µL/min)	$Q = \frac{0.498\ \Delta P}{\eta}$	$Q = \frac{3.26\ \Delta P}{\eta}$
Flowvelocity at the center of the channel (m/s)	$V_0(l) = \frac{2.08\ \Delta P}{(1.59\ l + 5)\eta}$	$V_0(l) = \frac{20.38\ \Delta P}{(40.46\ exp^{0.00376\ l} - 20)\eta}$
Electric velocity at the center of the channel (kV/m)	$E_0(l) = \frac{420\ V}{(1.59\ l + 5)}$	$E_0(l) = \frac{240\ V}{(40.46\ exp^{0.00376\ l} - 20)}$

29. Dion,V., Lin,Y., Hubert,L., Waterland,R.A. and Wilson,J.H. (2008) Dnmt1 deficiency promotes CAG repeat expansion in the mouse germline. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1306–1317.

30. Campeau,E., Ruhl,V.E., Rodier,F., Smith,C.L., Rahmberg,B.L., Fuss,J.O., Campisi,J., Yaswen,P., Cooper,P.K. and Kaufman,P.D. (2009) A Versatile Viral System for Expression and Depletion of Proteins in Mammalian Cells. *PLoS ONE*, **4**, e6529.

Conclusion du chapitre 4

Ce chapitre nous a permis de montrer l'utilisation de µLAS dans un contexte de biologie clinique. *A posteriori*, le diagnostic de la maladie de Huntington a constitué une application délicate dans la mesure où l'analyse est rendue difficile par l'hétérogénéité des tailles de fragments de l'échantillon, la difficulté d'amplifier des séquences répétées et le fait qu'il faut atteindre une précision de 3 paires de bases (équivalent à une répétition) pour le diagnostic. Toutefois cette étude nous a permis de mettre en place et de calibrer la mesure comparative de tailles pour µLAS dans sa version double canaux. En outre, cette étude montre l'analyse d'échantillons amplifiés à très faibles nombres de cycles PCR. Cette perspective est intéressante pour limiter les risques d'amplifications de fragments non spécifiques lors des étapes de PCR, notamment pour les maladies causées par l'expansion de région à répétitions trinucléotidiques.

Chapitre 5.

Application à l'analyse de l'ADN circulant

De l'échantillon purifié vers l'échantillon plasmatique

L'analyse de l'ADN circulant dans le sang en quantités résiduelles doit permettre de démontrer le potentiel applicatif de µLAS. Aujourd'hui, tous les systèmes d'analyses commerciaux travaillent avec des échantillons d'ADN purifiés le plus souvent avec un procédé de chromatographie d'affinité. Pour cette thèse, nous avons souhaité réaliser l'analyse de l'ADN circulant sans purification préalable avec µLAS. Ce choix est en partie guidé par le fait que le format industriel de µLAS mis en œuvre par Picometrics Technologies (BIABooster) permet déjà de caractériser l'ADN circulant purifié avec des performances à l'état de l'art international. L'analyse directe de l'ADN circulant dans un mélange biologique complexe est incompatible avec les technologies de séparation actuelles, et c'est un objectif attrayant pour accélérer, standardiser et simplifier les procédures analytiques. Dans ce chapitre, nous présenterons donc les résultats préliminaires obtenus pour l'analyse d'échantillons purifiés sous format puce et capillaires avant de présenter le développement d'une méthode pour l'analyse d'échantillons plasmatiques.

5.1. Analyse d'échantillons purifiés

Dans le premier chapitre, nous avons vu que la préparation de l'échantillon avant analyse du cfDNA est une étape critique qui manque souvent de standardisation. Face à cette problématique, nous avons eu l'occasion de tester, comparer et évaluer certaines méthodes d'extraction et de caractérisation. Ce travail nous a permis de nous « faire la main » sur la manipulation de plasma et l'extraction d'ADN. Une partie des travaux présentés dans cette section ont été obtenus par Louisa Boyer et Fanny Mermet-Meillon pendant leurs stages, que nous avons co-encadré dans le cadre de notre projet.

5.1.1. Extraction de l'ADN plasmatique

5.1.1.1. Origine et conditionnement du plasma

Des échantillons de sang fournis par l'EFS (Etablissement Français du Sang) ont été utilisés pour la plupart des expériences. Le sang frais de donneurs sains est collecté par l'EFS dans des tubes EDTA et traité au sein du LAAS dans un délai de 4 heures après collection. Afin de standardiser nos résultats avec un échantillon mère de grand volume, nous regroupons les échantillons issus de plusieurs donneurs. Nous faisons ensuite une première centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes à température ambiante pour séparer le plasma (phase supérieure) des globules rouges (phase inférieure) et des globules blanc et des plaquettes (à l'interface). Le plasma est alors recueilli et il subit une seconde et troisième centrifugation à 4500 g puis 16000 g pendant 20 minutes respectivement afin d'éliminer toutes traces de cellules ou fragments de cellules au fond du tube. Le plasma est alors aliquoté et stocké à -20°C.

5.1.1.2. Comparaison des méthodes d'extraction de cfDNA

Sans connaissance des procédés d'extraction d'ADN, nous avons voulu comparer deux kits d'extractions de cfDNA. Nous avons choisi deux kits communément utilisés, à savoir le QIAamp blood DNA Midi Kit (Qiagen) et le plasma/serum cell-free circulating DNA purification mini Kit (Norgen Biotek). Afin d'évaluer le rendement d'extraction indirectement, nous avons ajouté 500 ng de 100 bp ladder (Ozyme) ou de 1 kb ladder (NEB) dans les échantillons de plasma avant extraction. Cet ADN

ajouté est « différent » de celui contenu dans le plasma car il n'est pas protéinisé avec des histones par exemple. Conformément aux recommandations du fabricant, nous avons réalisé une purification avec 500 µL de plasma avec ADN à 1 ng/µL avec le Norgen Kit, tandis que 100 µL du même échantillon à 5 ng/µL ont été purifiés avec le QIAamp Kit. Pour les deux kits, l'ADN extrait était élué avec un volume de 50 µL de tampon. La quantité de cfDNA de l'échantillon étant négligeable par rapport à la quantité d'ADN ajouté, on considère qu'un rendement d'extraction de 100% correspond à une concentration de ~10 ng/µL après élution (Figure 5.58). La quantification de l'ADN extrait a été réalisée en utilisant la mesure Qubit dsDNA HS Assay Kit (présenté au Chapitre 1, 1.3.1). Le laboratoire ne disposant pas d'un fluoromètre Qubit, nous avons utilisé le lecteur de fluorescence Varioskan (Thermo Fischer Scientific) pour la mesure aux longueurs d'ondes $\lambda_{ex/em}$ = 500/530 nm.

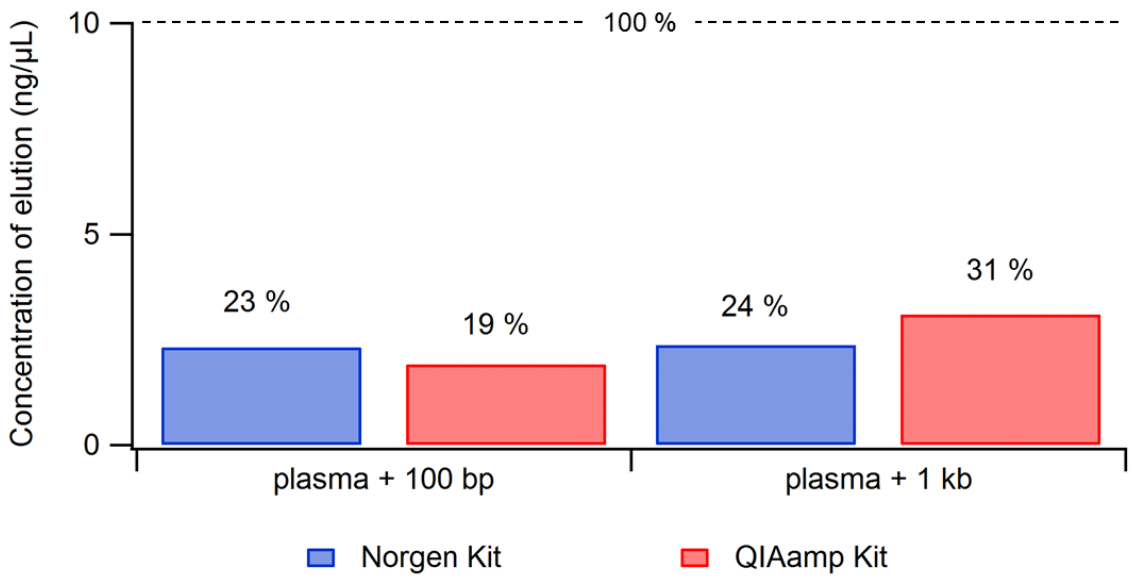


Figure 5.58. Comparaison des rendements d'extraction du Norgen Kit et du QIAamp Kit pour un échantillon de plasma spiké avec du 100 bp ou 1 kb ladder.

Pour le Norgen Kit, nous avons obtenu des rendements d'extraction similaires pour le 100 bp ladder et le kb ladder (23% et 24%, respectivement). Le QIAamp Kit a donné un meilleur rendement d'extraction pour les ADN de plus hauts poids moléculaires (31% pour le kb ladder), mais avec une importante dépendance selon la taille de l'ADN puisque le rendement est de 19% pour le 100 bp ladder. Ces rendements sont inférieurs à ceux annoncés par les fournisseurs de 80. Pour nos travaux, ils ont néanmoins toujours été de l'ordre de 20% pour quatre opérateurs différents. On peut alors faire l'hypothèse qu'une partie de l'ADN n'est pas capturée par la colonne, ou que l'ADN ajouté ne se

comporte pas exactement comme l'ADN circulant du fait d'une association différente aux protéines du plasma. De plus l'efficacité de l'extraction varie en fonction des kits, et en fonction des tailles d'ADN au sein d'un même kit. Ces observations sont en accord avec les problématiques de standardisations évoquées dans le chapitre premier (partie 1.2.3) et renforcent l'intérêt de pouvoir analyser des échantillons sans étape de purification.

Retenons tout de même qu'un des avantages des kits est la concentration de l'ADN circulant puisque certaines versions de kits comme le Plasma/Serum Cel-Free Circulating DNA Purification Midi Kit (Norgen Biotek) permettent de traiter jusqu'à 4 mL de plasma et de collecter le cfDNA extrait dans un volume aussi petit que 100 µL, permettant une pré-concentration par un facteur 40 en supposant le rendement de 100%.

5.1.2. Séparation d'ADN circulant par µLAS

Pour la séparation du cfDNA par µLAS, un échantillon de 500 µL de plasma a été purifié en utilisant le Norgen Kit. L'échantillon purifié a ensuite été dilué par un facteur 2 dans le tampon de séparation (TBE 2x, PVP 6%, DTT 2%, YOPRO 20 nM). Une référence de taille est préparée par dilution par un facteur 500 du 100 bp ladder dans le tampon d'élution du kit. Cette solution est alors diluée par un facteur 2 dans le même tampon de séparation que pour l'échantillon. La concentration finale du 100 bp ladder dans l'échantillon de référence est d'environ 8 ng/mL (ce qui est dans l'ordre de grandeur des concentrations en cfDNA du plasma). Les échantillons sont injectés dans une puce à double canaux (Figure 5.59).

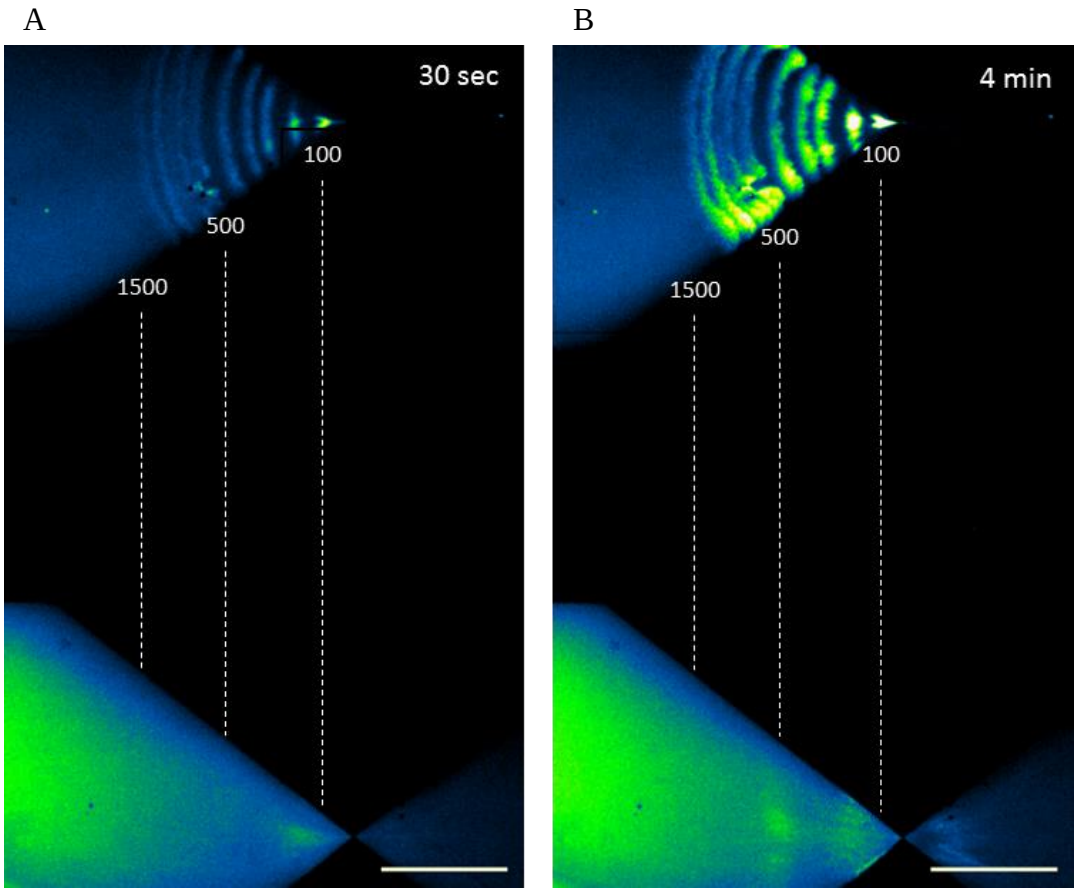


Figure 5.59. Séparation du cfDNA extrait d'un échantillon de plasma (en bas) et d'un 100 bp ladder de référence (en haut). A) Après 30 secondes de séparation. B) Après 4 minutes de séparation. Les conditions sont 6,8 bars et 108 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 8,1 cm/s et un champ électrique de 9072 kV/m à la constriction. L'échelle correspond à 100 µm.

Après 30 secondes de séparation, il est possible d'observer la formation d'une bande entre 100 bp et 200 bp pouvant correspondre à la taille de l'ADN d'un nucléosome. A partir de 4 minutes, on observe la formation d'une seconde bande de plus haut poids moléculaire autour de 500 bp. La taille de cette deuxième bande est difficile à évaluer avec précision dans la mesure où les bandes de la référence ont été saturées en 4 minutes et se sont déplacées vers la constriction (cf. chapitre 2, partie 2.3.3). En dépit du fait que la mesure ne puisse être réalisée avec précision, ce résultat démontre que µLAS possède la sensibilité pour établir des profils de cfDNA extraits à partir d'échantillons plasmatiques.

5.1.3. Séparation d'ADN circulant par BIABooster

Nous avons vu précédemment que le principe de fonctionnement de µLAS a été transféré industriellement sous le format capillaire (BIABooster) par Picometrics Technologies pour l'analyse du sang circulant. Les résultats présentés dans cette sous-section le sont avec l'accord de Picometrics Technologies et font l'objet d'une publication en cours de révision à la revue *Analytical Chemistry*.

5.1.3.1. Présentation de la technologie BIABooster

Le système BIABooster utilise l'emboitement de deux capillaires de diamètres différents pour obtenir une constriction (Figure 5.60). Le montage est ensuite intégré à un instrument d'électrophorèse commercial pour contrôler l'écoulement et le champ électrique. A la différence de µLAS, la concentration et la séparation de l'ADN sont réalisés séquentiellement. Une première étape permet de concentrer les fragments d'ADN au niveau de la constriction. Une seconde étape consiste à moduler le champ électrique pour séparer les fragments dans le capillaire en aval de la constriction. La vitesse de migration dépend de la taille des fragments d'ADN et un détecteur permet d'enregistrer le passage des bandes.

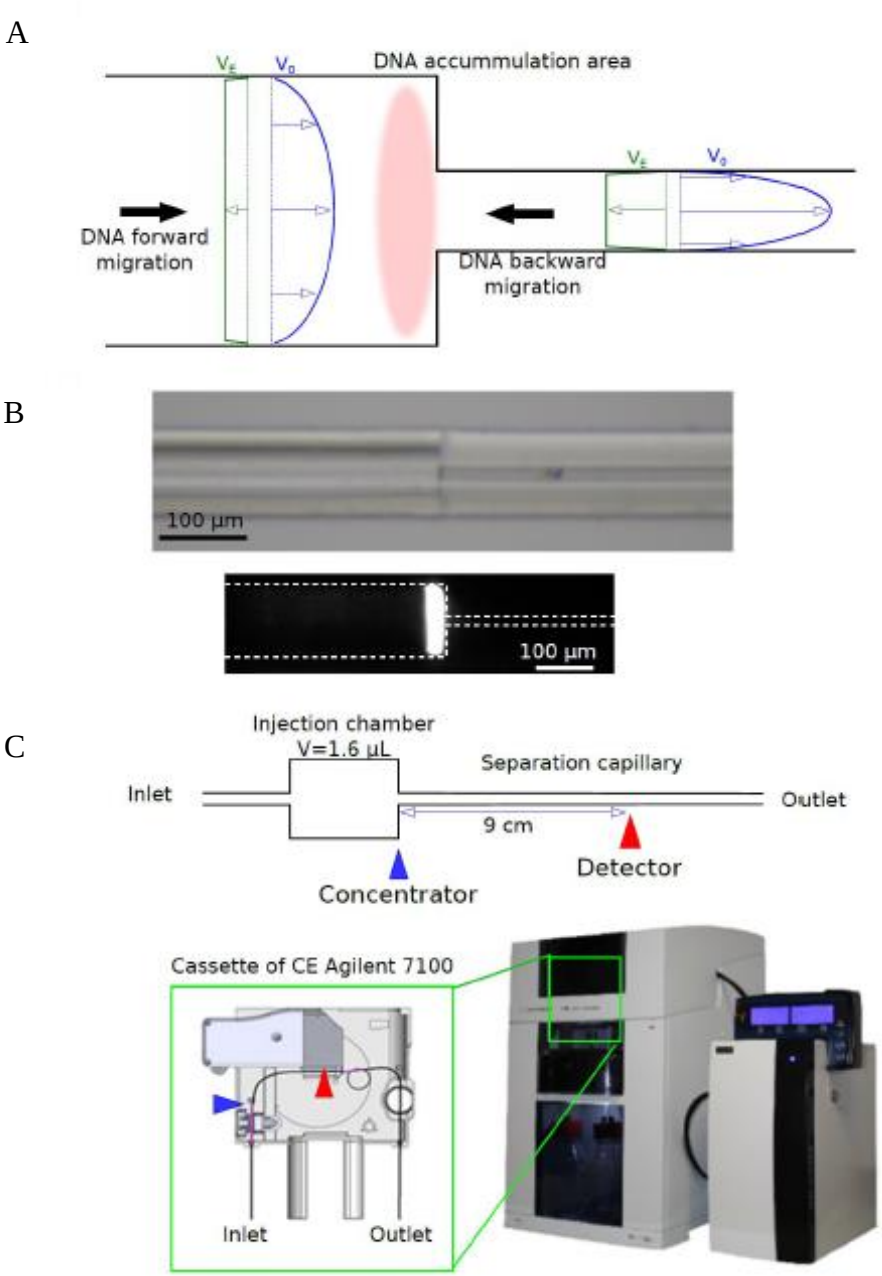


Figure 5.60. Système BIABooster pour la concentration, la séparation et la détection d'ADN. A) Le transport de l'ADN est dominé par l'hydrodynamique en amont de la constriction et par l'électrophorèse en aval de la constriction, forçant l'accumulation au niveau de la constriction. B) Démonstration expérimentale de la concentration de fragments d'ADN de 5 kb par l'emboîtement de deux capillaires de 100 et 20 µm de diamètres internes. C) Présentation du système complet du BIABosster et de l'intégration dans l'instrument d'électrophorèse capillaire équipé d'un détecteur de fluorescence.

En dehors du fonctionnement séquentiel, plusieurs différences avec µLAS sont à relever. Pour le BIABooster, le protocole de concentration et de séparation est un peu plus long (de l'ordre de 30 minutes). Le format capillaire permet d'atteindre des débits plus importants qu'en format puce et la séparation en aval de la constriction permet de collecter des fractions de l'échantillon. Enfin la

vitesse d'enrichissement ne dépend pas de la taille des fragments ce qui permet de conserver la distribution en concentration entre les bandes.

Picometrics Technologies a appliqué le système BIABooster à l'analyse de fragments d'ADN entre 100 et 1500 bp. La limite de détection du système est 0,01 pg/µL et la précision sur la mesure de taille est de 3 %. Par conséquent, les performances de ce système sont adaptées pour l'analyse de l'ADN circulant.

5.1.3.2. Résultats de séparation d'ADN purifié

Le cfDNA a été extrait pour différents échantillons plasmatiques issus d'individus sains (achetés chez Biopredict ou Wilmington et Biological Specialty Corporation) ou de patients atteints de cancers colorectaux (issus d'une étude prospective menée au sein de l'hôpital européen Georges Pompidou et fournis par l'Université Paris Descartes) ou de mélanomes (issus d'une étude menée par le département Multidisciplinary and Therapeutic innovations et le service de dermatologie, vénéréologie et cancérologie cutanée, de l'Assistance Publique Hôpitaux de Marseille). Pour plus d'informations cliniques sur les échantillons et les matériels et méthodes utilisés, nous invitons le lecteur à consulter l'article soumis à la revue *Analytical Chemistry* et intitulé « BIABooster: On-line DNA concentration and size profiling with a limit of detection of 10 fg/µL. Application to high-sensitivity characterization of circulating cell-free DNA». Les profils obtenus au BIABooster présentent généralement un pic prédominant autour de 150 bp, un pic secondaire vers 300 bp, et parfois un troisième pic plus petit vers 450-500 bp. Il est également intéressant de noter la présence de fragments de haut poids moléculaire pour certains échantillons >2 kbp (Figure 5.61).

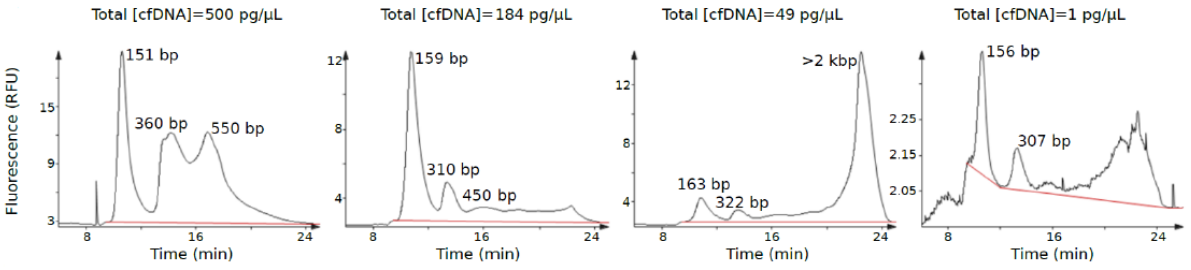


Figure 5.61. Profil de cfDNA typiques pour des concentrations en cfDNA total variant entre 1 et 500 pg/µL. La ligne de base est représentée en rouge.

Picometrics Technologies propose d'utiliser le BIABooster pour contrôler la qualité du cfDNA de l'échantillon, en évaluant l'intégrité du cfDNA ou la présence de fragments de hauts poids moléculaires issus de cellules sanguines. Par ailleurs les premiers résultats suggèrent qu'il existerait une différence de la distribution en tailles et en concentration entre des individus sains et des individus atteints de cancer (Figure 5.62).

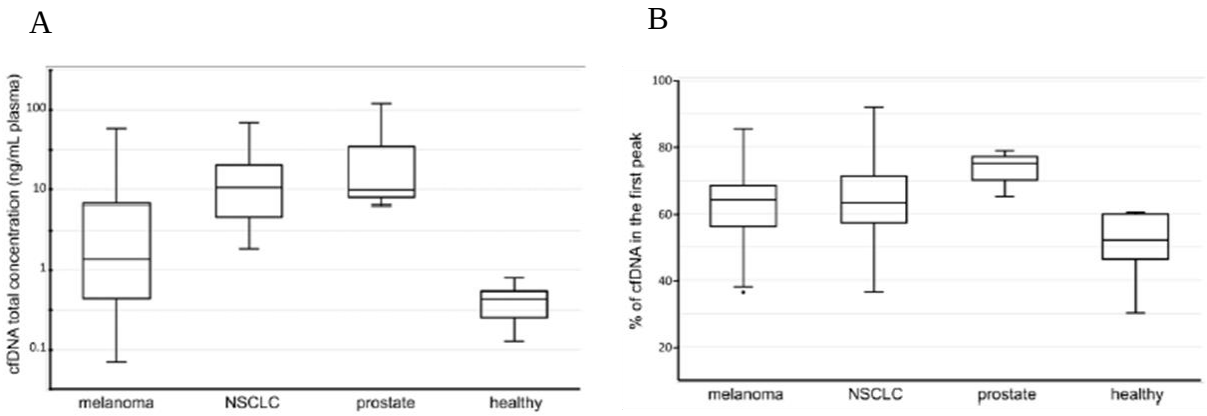


Figure 5.62. L'utilisation du profil de cfDNA comme biomarqueur du cancer du mélanome, du poumon et de la prostate avec le BIABooster. A) Comparaison des concentrations totales en cfDNA. B) Comparaison du pourcentage en cfDNA dans le premier pic (75-239 bp).

Picometrics Technologies a comparé les résultats obtenus pour une cohorte de patients atteints de mélanomes (n=32), de NSCLC (non-small cell lung cancer, n=33), de cancers de la prostate (n=3) et d'individus sains (n=8). Ils ont observé des différences de concentrations moyennes entre les individus sains et les individus atteints de cancers (Figure 5.62A). Par ailleurs ils ont comparé les proportions d'ADN dans le premier pic prédominant (concentration d'ADN entre 75 et 239 bp divisé par la concentration d'ADN entre 75 et 1649 bp), pour obtenir un indicateur non sans rappeler l'index d'intégrité décrit dans le chapitre 1 (1.2.1.2). Ils ont conclu que la proportion d'ADN dans le premier pic avait un potentiel intéressant pour servir de biomarqueur du cancer (Figure 5.62B). Notons toutefois que ces résultats préliminaires doivent être confirmés par des études cliniques sur une plus large cohorte d'échantillons.

5.2. Manipulation directe du plasma sur puce pour l'analyse du cfDNA

Dans cette section, nous présentons les développements réalisés pour l'analyse directe d'échantillons plasmatiques avec la technologie µLAS. Les principales difficultés sont liées à l'optimisation de la dilution du plasma dans le tampon de séparation pour éviter des phénomènes de précipitation, qui se traduisent par la perturbation de l'écoulement et l'encrassement des puces. Une partie des travaux présentés dans cette section ont été obtenus par Fanny Mermet-Meillon et Huynh Hai Truc Ngo pendant leurs stages.

Nous avons notamment investigué l'efficacité du marquage fluorescent des ADN dans le plasma et les phénomènes d'agrégations protéiques, en testant des conditions de digestions enzymatiques (choix de l'enzyme et des agents dénaturants), de températures d'incubations, et en évaluant les interactions avec les éléments du tampon de séparation.

5.2.1. Compatibilité de µLAS avec des échantillons plasmatiques

En première intention, nous avons évalué la compatibilité de µLas avec des échantillons plasmatiques dans lesquels le 100 bp DNA ladder a été ajouté. Le plasma est soumis à un traitement à la Protéinase K (1 mg/mL) avec du surfactant SDS (1%) à 42°C pendant 1 H pour digérer les protéines plasmatiques. Le plasma est ensuite dilué par un facteur 10 dans notre tampon de séparation (TBE 1x, PVP 5%, DTT 2%, YOPRO 100 nM) de manière à obtenir une concentration finale en ADN spiké de 500 ng/mL. Il est enfin injecté dans un canal pour observation (Figure 5.63).

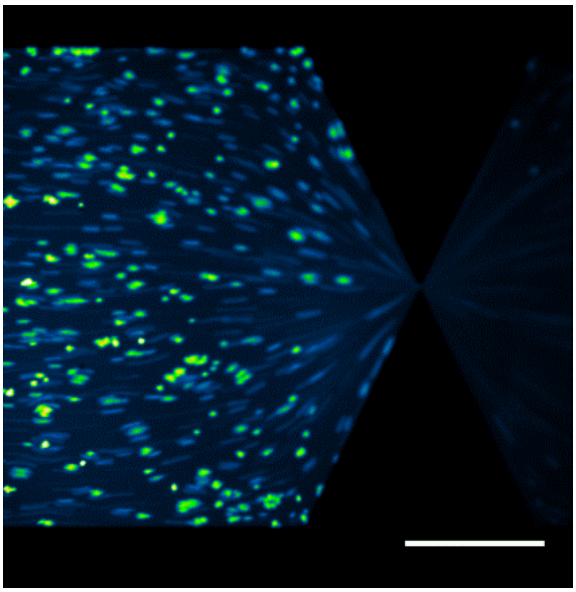


Figure 5.63. Observation du plasma dilué à 10% dans le tampon de séparation en écoulement dans le canal. L'échelle correspond à 150 µm.

Etonnamment, nous avons observé la formation d'agrégats fluorescents de plusieurs micromètres de diamètres qui perturbent l'écoulement et l'observation dans la canalisation. Ces agrégats sont probablement de nature protéique. En effet, les protéines plasmatiques ont tendance à former des agrégats lorsque les conditions de pH et de salinité non physiologiques, ce qui est le cas pour notre tampon d'électrophorèse supplémenté avec du DTT et du PVP. La formation des agrégats est clairement liée à la dilution du plasma dans notre tampon de séparation. En effet lorsque du plasma, dans lequel a été ajouté de l'ADN marqué avec un intercalant, est injecté sans dilution, nous n'avons pas observé d'agrégats. De plus lorsque le plasma ne contient pas d'ADN ajouté et qu'il est dilué dans le tampon en présence d'intercalant, nous observons des agrégats fluorescents. En conséquence, il semble que ces agrégats soient protéiques et révélés par le fluorophore de marquage de l'ADN, qui est introduit en excès.

Il est à noter qu'après une étape de centrifugation à 16000 g pendant 10 min, nous avons constaté la formation d'un culot protéique, avec une perte probable de l'ADN circulant en interaction avec les protéines. L'injection du surnageant dans le canal permet d'observer que la majorité des agrégats est éliminée (Figure 5.64).

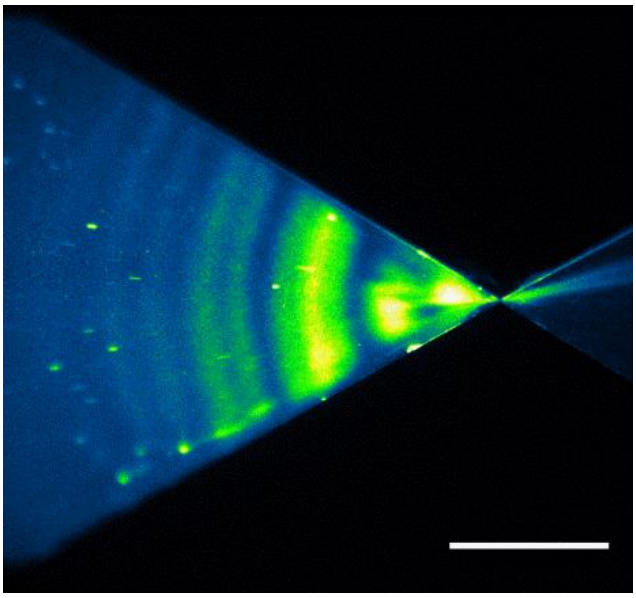


Figure 5.64. Compatibilité de µLAS pour la séparation de plasma à 10% spiké avec un 100 bp ladder. Les conditions sont 6.4 bars et 108 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 36,6 cm/s et un champ électrique de 7020 kV/m à la constriction. L'échelle correspond à 150 µm.

Par ailleurs, nous avons observé la séparation du 100 bp ladder spiké dans le plasma. Ainsi de l'ADN est encore présent en solution après centrifugation et la séparation par µLAS semble être compatible avec un échantillon plasmatique digéré à la protéinase K dilué par un facteur dix.

5.2.2. Influence du tampon de séparation sur le plasma

Suite à ces expériences préliminaires, nous avons cherché à comprendre l'origine de la formation des agrégats afin de mieux contrôler leur apparition pendant le conditionnement du plasma. Les différents mécanismes d'agrégation des protéines ont été largement étudiés[1,2]. Les protéines constituantes du plasma et les facteurs qui jouent un rôle dans leur précipitation (sels, pH, température) sont également très bien décrits dans la littérature[3]. Pour éviter toutes réactions indésirables, les échantillons plasmatiques sont généralement dilué dans du PBS (Phosphate Buffered Saline), car proche des conditions physiologiques. Pour nos échantillons plasmatiques, la présence d'EDTA (dissous dans les tubes de collection de sang et dans le tampon de séparation) est censée prévenir la cascade de coagulation. Toutefois l'EDTA ne bloque pas les interactions électrostatiques et comme les protéines sont placées en conditions non physiologiques, elles ont une forte tendance à s'auto-agréger en structure polymérique de fibrille amyloïde[4–6]. Ainsi, Taboada et al. ont montré la formation de fibrilles amyloïdes et d'autres types d'agrégats d'albumine, qui est la protéine la plus présente dans le plasma, notamment après incubation à 65°C pendant 6 heures[7].

Le DTT et les polymères du tampon peuvent également provoquer la précipitation et l'agrégation des protéines. Wang et al. ont ainsi montré que l'utilisation de 5 mM (~0,8 % en masse/volume) de DTT pour casser les ponts disulfures intramoléculaires des protéines du plasma, a pour résultat l'exposition des parties hydrophobes des protéines et leur agrégation[8]. En ce qui concerne les polymères, des solutions de PVP (polyvinylpirrolidone), PEG (polyethylene glycol), PVA (polyvinyl alcohol), ou des mélanges ont été utilisés pour le fractionnement de mélanges de protéines[9] et la précipitation des protéines[10,11]. Brièvement, la précipitation est causée par des phénomènes d'exclusion volumique. Les protéines sont stériquement exclues de régions du solvant occupées par le polymère et leur concentration effective peut dépasser la concentration de solubilité, causant leur précipitation. Par exemple, Atha et al. ont utilisé des solutions de PEG de différents poids moléculaires (4 ou 20 kDa) jusqu'à 40% en concentration pour montrer la précipitation de protéines plasmatiques telles que de l'albumine, du fibrinogène, ou encore des globulines[10]. Similairement Woiszwillo a utilisé des mélanges de PEG (3,5 kDa) et PVP (40 kDa) entre 10% et 20% en concentrations sur des échantillons de plasma humains[11]. Engelsman et al, ont proposé une revue des différentes techniques pour évaluer l'agrégation des protéines. Parmi ces techniques, on retrouve l'observation microscopique et la mesure de densité optique notamment[12].

Pour identifier les composants du tampon de séparation qui provoquent la formation d'agrégats, nous avons incubé du plasma avec différentes formulations du tampon. Après 30 minutes d'incubation, les échantillons ont été centrifugés à 16000 g pendant 10 minutes pour observer la formation d'un culot (Figure 5.65). Nous avons rapidement identifié que la présence de DTT provoque la formation d'un culot beaucoup plus important. En revanche la présence de PVP n'a pas d'effet visible sur la précipitation.

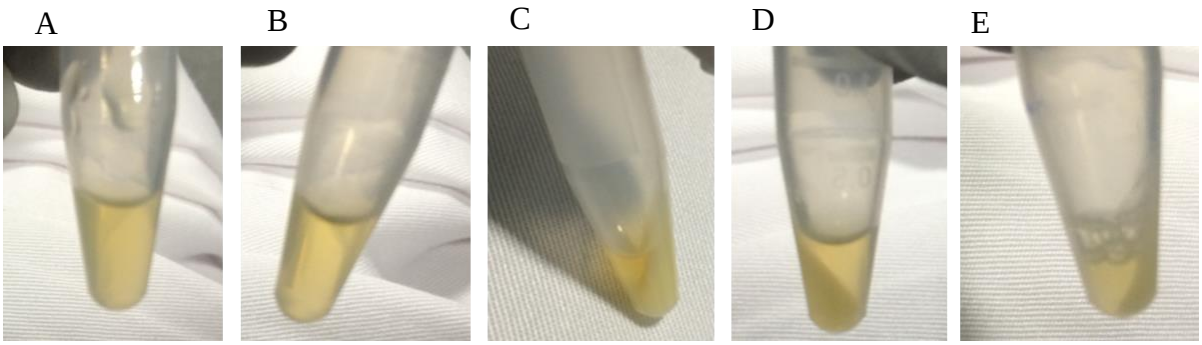


Figure 5.65. Tests de précipitation après centrifugation à 16000 g pendant 10 minutes. A) Mélange (50/50) de plasma avec du TBE 2x. B) Mélange (50/50) de plasma avec du TBE 2x, PVP (1,3MDa) 6%. C) Dissolution de DTT à 1% dans du plasma. D) Mélange (50/50) de plasma avec du TBE 2x, DTT 2%. E) Mélange (50/50) de plasma avec du TBE 2x, PVP 6%, DTT 2%. On observe la formation d'un culot dans les tubes C, D, et E en présence de DTT.

Ce test a remis en cause l'utilisation du DTT, qui n'est pas indispensable pour la séparation du cfDNA dans le plasma. Toutefois nous gardons à l'esprit que l'ajout de DTT suivi d'une étape de centrifugation peut être mis à profit pour éliminer les micro-agrégats de protéines plasmatiques.

Pour confirmer que la présence de PVP ne provoque pas la formation de micro agrégats en suspension lors de la centrifugation, nous avons effectué des mesures de densité optique (DO) au Nanodrop pour du plasma dilué par un facteur 5 dans des solutions de TBE 1x avec des concentrations de PVP variant entre 0, 0,5%, 1%, 2%, et 4% (Figure 5.66). En effet, la présence de micro-agrégats rend la solution diffusante et augmente son absorbance.

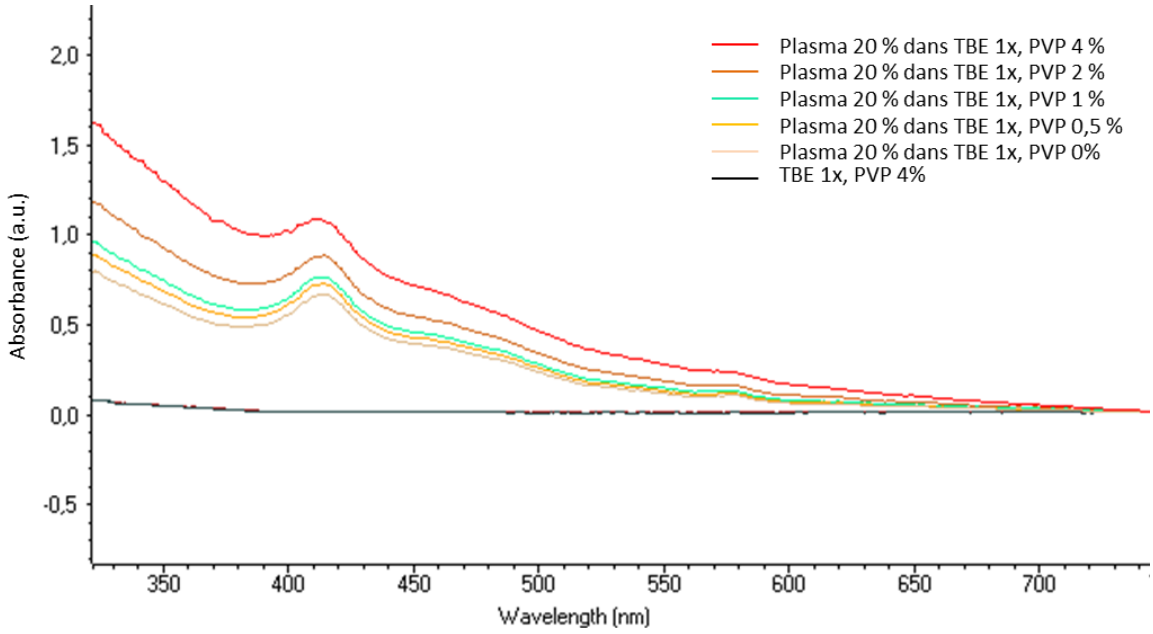


Figure 5.66. Influence de la concentration en PVP sur l'absorbance du plasma mesurée au Nanodrop.

Le spectre du plasma est caractérisé par une forte absorbance dans les UV (<350 nm) à cause de la forte concentration en protéines (particulièrement à 280 nm à cause des acides aminés avec des cycles aromatiques) avec un pic d'absorbance caractéristique à 420 nm lié à la présence de l'hémoglobine, ce qui explique la couleur orangée du plasma[13]. Par ailleurs, la solution PVP à 4% dans du TBE 1x a une absorbance nulle sur toute la gamme de longueur d'onde sondée (Figure 5.66). Nous avons observé que l'ajout d'une concentration croissante de PVP se traduit par une augmentation progressive de l'absorbance, ce qui suggère que la présence du polymère induit de la micro-agrégation si le plasma n'est pas traité.

Notons enfin que la dénaturation des protéines peut aussi être provoquée par la température[14], notamment au-delà des températures physiologiques pour les protéines plasmatiques[15]. Lorsque nous avons incubé des échantillons plasmatiques à des températures supérieures à 50°C, nous avons systématiquement observé la formation d'un culot après centrifugation (Figure 5.67).

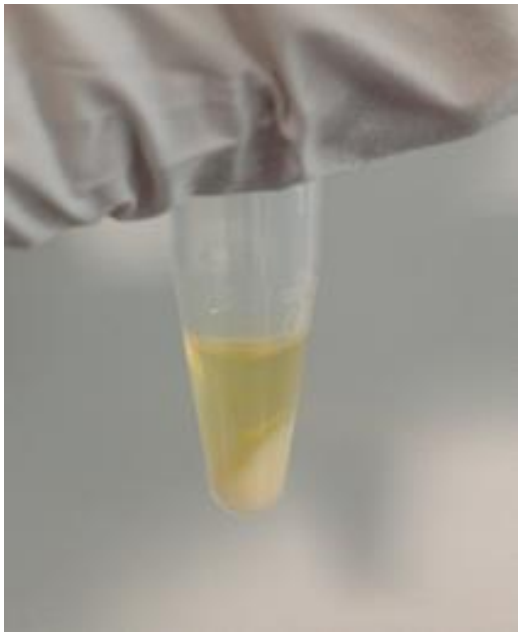


Figure 5.67. Echantillon plasmatique après incubation à 95°C pendant 1 H et centrifugation à 16000 g pendant 10 minutes.

Pour limiter l'agrégation dans le canal à cause du PVP ou de la température, ces résultats nous amènent à mettre en place une étape de digestion protéique.

5.2.3. La digestion des protéines du plasma

Pour la séparation par µLAS, il est indispensable que l'ADN soit libre de toutes interactions protéiques. Par conséquent, nous avons mis en place une étape de digestion enzymatique (que l'on retrouve notamment dans tous les kits de purification commerciaux) qui peut également servir à limiter la formation d'agrégats.

Pour cette étude, nous avons utilisé le traitement « standard » avec de la protéinase K (1 mg/mL) et du SDS à 1% pendant 1 H à 55°C. La protéinase K permet de digérer les protéines,

préférentiellement après les acides aminés hydrophobiques. Le SDS est utilisé pour dénaturer les protéines en supprimant les liaisons non covalentes et faciliter l'accès à la protéinase K. Pour observer l'effet de la digestion, nous avons divisé un échantillon plasmatique en deux. Le premier échantillon est traité à la protéinase K et SDS, tandis que le second sert de contrôle. Les deux échantillons sont incubés 1 heure à 55°C et centrifugés 10 minutes à 16000 g (Figure 5.68).

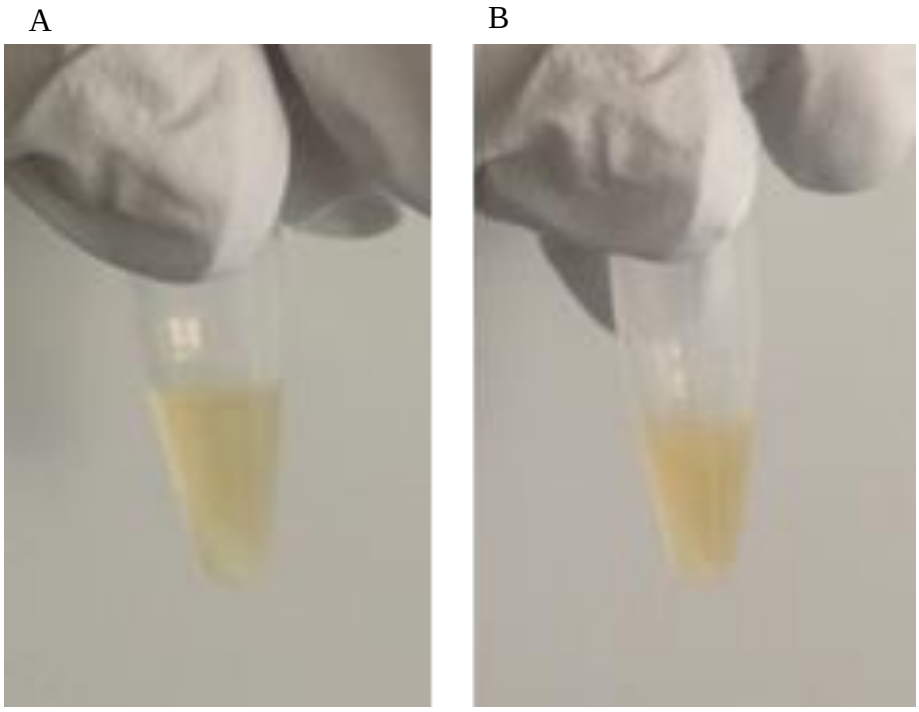


Figure 5.68. Echantillons plasmatiques après incubation à 55°C pendant 1 heure et centrifugation à 16000 g pendant 10 min. A) Echantillon traité à la protéinase K en présence de SDS. B) Contrôle sans traitement enzymatique.

L'échantillon traité à la protéinase K est plus clair que le contrôle, et nous obtenons un culot plus important. Pour un échantillon digéré à la protéinase K et centrifugé, le surnageant est mélangé avec différentes concentrations de PVP pour évaluer la formation d'agrégats et une mesure de densité optique est à nouveau réalisée (Figure 5.69).

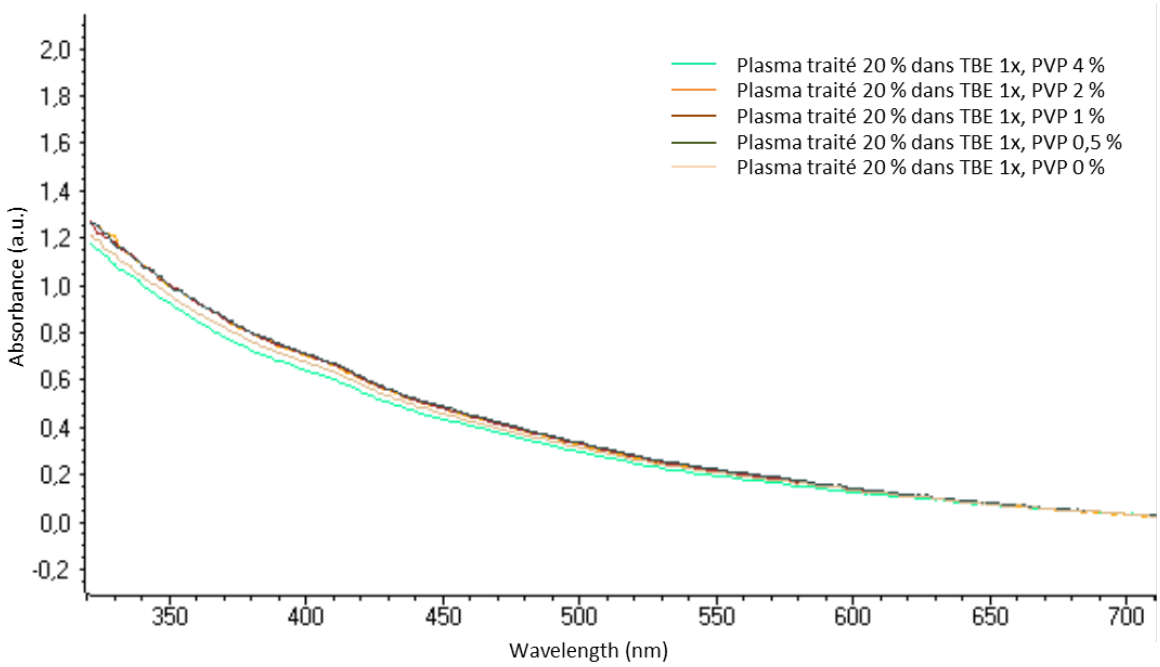


Figure 5.69. Influence de la concentration en PVP sur l'absorbance du plasma digéré à la protéinase K, triton X-100 et centrifugé, mesurée au Nanodrop.

L'étape de digestion ne change pas le profil d'absorbance à 280 nm. En effet on observe toujours un pic lié à l'ajout des protéinases K, et l'absorbance des acides aminés aromatiques est conservée avec la digestion. Toutefois, nous observons la superposition des tracés d'absorbance pour différentes concentrations en PVP. De plus, le pic à 420 nm est à peine perceptible. Ce résultat semble suggérer que la digestion est efficace et que, lorsqu'elle est suivie d'une étape de centrifugation des protéines, elle limite la présence d'agrégats lors du mélange avec la solution de PVP.

Toutefois malgré la digestion, nous avons tout de même observé la présence d'agrégats avant (Figure 5.63) et après centrifugation (Figure 5.64) dans notre canal microfluidique. Ce traitement ne nous est donc pas apparu satisfaisant. De plus, le SDS pose quelques problèmes pour la technologie de séparation µLAS, car il atténue l'intensité de fluorescence de nombreux fluorophores (comme le YOYO-1) et il favorise une électro-osmose mal contrôlée très délétère pour la séparation[3].

En conséquence, nous avons remplacé le SDS par du Triton X-100 et la protéinase K par la pronase. La pronase est un mélange de protéases, qui digère complètement les protéines en acides aminés individuels.

[3] On soupçonne que le SDS agit comme compétiteur d'affinité pour recouvrir les surfaces. Nous avons observé des phénomènes de recirculation non contrôlés prévenant la formation des bandes.

Nous avons incubé du plasma avec de la pronase (1 mg/mL) et du triton 1% à 37°C pendant 3 heures pour s'assurer de la digestion complète des protéines. Une étape de centrifugation à 16000 g est effectuée sans formation de culot (Figure 5.70). Nous attribuons la couleur plus prononcée de l'échantillon à l'utilisation de la pronase, elle-même orangée en solution.

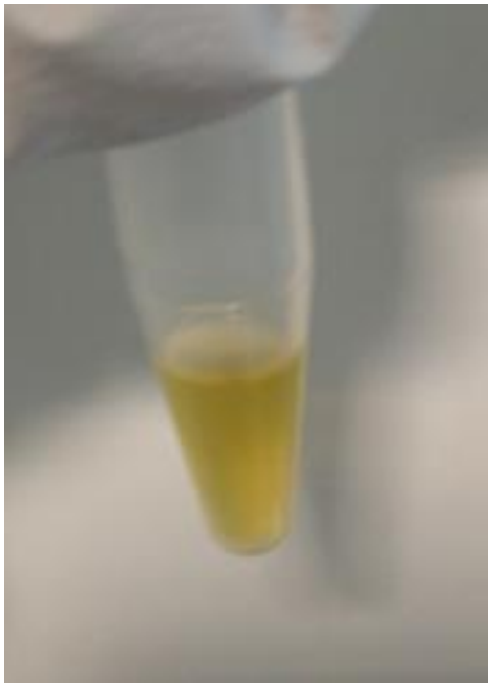


Figure 5.70. Echantillon plasmatique après traitement à la pronase (1 mg/mL), triton 1% à 37°C pendant 3 heures suivi d'une centrifugation à 16000 g pendant 10 minutes.

Finalement, après s'être assuré que la solution obtenue est compatible avec une opération sur µLAS, ce protocole de digestion de l'échantillon a été retenu pour l'analyse du plasma sur puce.

5.2.4. Le marquage de l'ADN circulant dans le plasma

Au cours de nos expériences, nous avons remarqué que l'intensité de fluorescence de l'ADN était atténuée dans le plasma par rapport aux solutions purifiées, nécessitant l'augmentation par un facteur 10 des concentrations en fluorophores. Pour confirmer cette observation, nous avons mesuré la fluorescence d'une solution de TE (Tris-EDTA) 1x mélangé avec du 100 bp ladder avec celle d'un échantillon de plasma mélangé avec du 100 bp ladder et traité à la protéinase K pour différents temps d'incubation. Nous avons divisé un échantillon de plasma (10 ng/µL) en trois pour tester la

fluorescence de plusieurs intercalants. Les échantillons sont marqués au SYTOX Orange, YOYO-1 et YOPRO-1, respectivement, à une concentration de 1 µM. Les 3 échantillons sont alors divisés en 4 et incubés à 55°C pendant 0, 2, 4, 7, et 5 heures, respectivement. A la suite de l'incubation, les échantillons sont centrifugés à 16000 g pendant 15 minutes et la fluorescence du surnageant est mesurée au Varioskan (Figure 5.71).

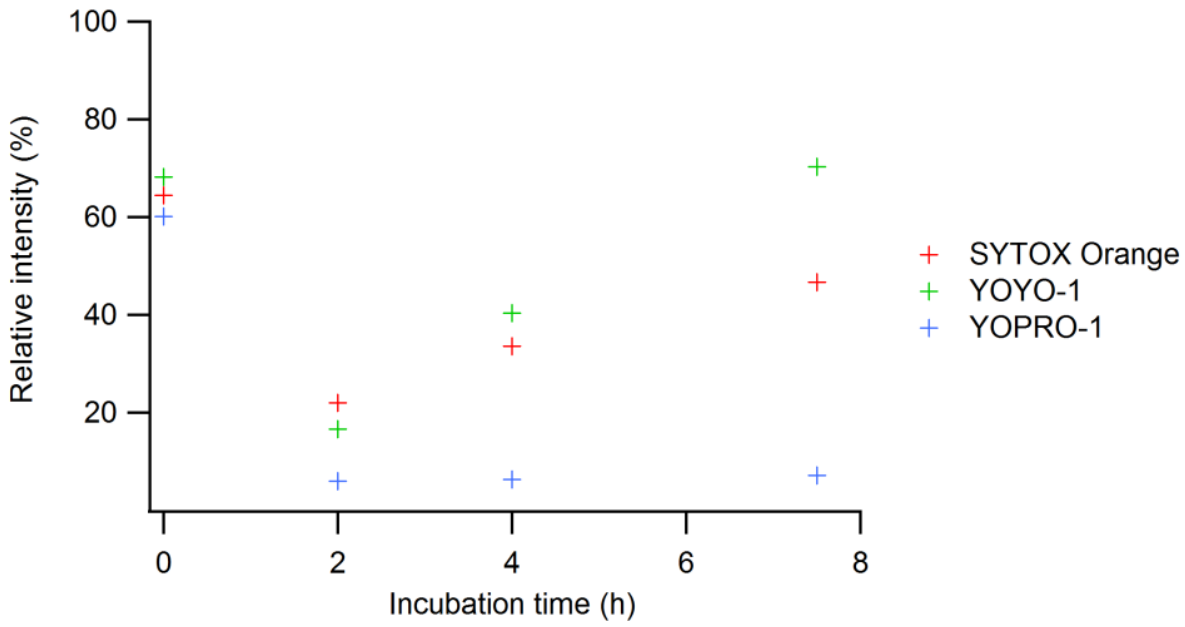


Figure 5.71. Ratio de l'intensité de fluorescence obtenue pour du SYTOX Orange, du YOYO-1 et du YOPRO-1 dans du plasma pour différents temps d'incubation à la protéinase K, à 55°C, contre la fluorescence obtenue dans du TE 1x. Le plasma et le TE 1x sont spikés avec du 100 bp ladder.

Pour les trois fluorophores, nous avons observé une chute immédiate de l'intensité de fluorescence de l'ordre de 40% entre la solution de TE 1x et l'échantillon plasmatique. Par ailleurs dans le plasma, la fluorescence diminue significativement pendant les deux premières heures d'incubation à 55°C avant de revenir proche de l'intensité initiale après 7,5 heures pour le SYTOX Orange et le YOYO-1. Toutefois la fluorescence reste très faible pour le YOPRO-1. Pour expliquer ces tendances, nous proposons l'hypothèse que les fluorophores interagissent avec les protéines du plasma et sont moins disponibles pour les molécules d'ADN pendant les premières heures d'incubation. Lorsque la digestion des protéines progresse, les molécules de SYTOX orange et de YOYO-1 (mais pas de YOPRO-1) redeviennent disponibles pour marquer les molécules d'ADN. L'hypothèse de l'interaction des molécules fluorescentes avec les protéines est en accord avec la nécessité d'augmenter les concentrations en fluorophores pour le marquage dans du plasma.

5.2.5. La séparation de l'ADN circulant dans le plasma

Finalement, le plasma est incubé avec de la pronase (1 mg/mL), Triton X-100 à 1% à 37°C pendant 3 heures pour s'assurer digestion complète des protéines. Une étape de centrifugation à 16000 g est effectuée sans formation de culot. L'échantillon de plasma traité est alors dilué par un facteur 2 dans le tampon de séparation TBE 2x, PVP 6%, YOYO-1 (1 µM) et injecté dans le canal. La séparation est réalisée à 2 bars et 112 V, correspondant à une vitesse d'écoulement de 13,7 cm/s et un champ électrique de 16464 kV/m à la constriction (Figure 5.72).

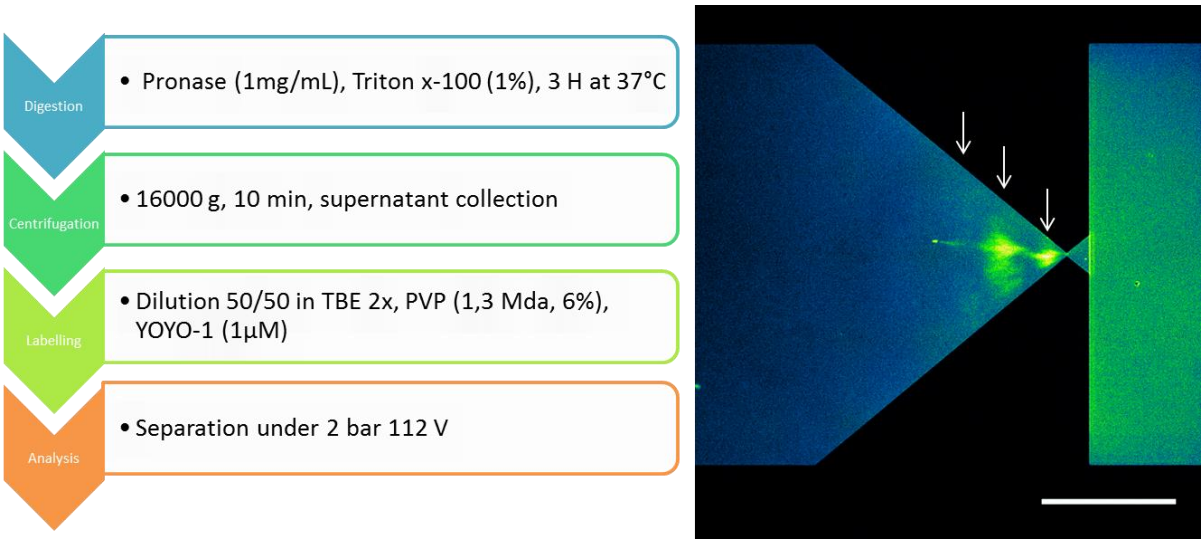


Figure 5.72. Protocole pré-analytique du plasma sanguin et résultat de la séparation par µLAS du cfDNA d'échantillon plasmatique dilué par un facteur 2 dans notre tampon de séparation. La position de trois tailles de fragments est indiquée par les flèches. Le bruit de fond en aval de la constriction est dû à une profondeur de canal plus importante. L'échelle correspond à 300 µm.

Nous avons observé la présence de 3 tailles de fragments. Lors de cette expérience, nous n'avions pas mis en place de référence pour la mesure précise de la taille des fragments. Toutefois il est très probable que ces trois fragments correspondent aux mono-nucléosomes, di-nucléosomes et tri-nucléosomes régulièrement retrouvés dans les séparations. Au-delà des considérations de mesure de tailles, ce résultat est essentiel pour la suite des développements de µLAS. Il permet de conclure qu'il est possible de séparer et détecter de l'ADN circulant dans un échantillon plasmatique ayant subi un traitement minimal. Notons toutefois que la partie pré-analytique reste relativement longue même si elle ne requiert pas l'attention d'un opérateur en continu. Des tests doivent être menés

pour définir s'il est possible de diminuer les temps de digestion enzymatique notamment, afin d'accélérer les procédures.

Conclusion du chapitre 5

Dans ce chapitre nous montré que la sensibilité de µLAS pouvait être appliquée à la détection de l'ADN circulant dans le plasma. Sous le format puce, une preuve de concept de la détection de fragments dont la taille est de l'ordre de celle du nucléosome a été réalisée pour des échantillons purifiés par des kits commerciaux. Sous le format capillaire, l'analyse de cfDNA extrait est réalisée en routine aujourd'hui avec une sensibilité supérieure aux systèmes d'électrophorèses commerciaux. Des différences de profil de taille ont même été observées entre des échantillons sains ou de patients cancéreux. Ce résultat préliminaire semble confirmer la pertinence du profil du cfDNA comme biomarqueur du cancer. Enfin nous avons mis au point une méthode de préparation minimale de l'échantillon plasmatique qui permet l'analyse directe après dilution par un facteur 2 dans le tampon de séparation. Même si d'autres développements et tests de confirmation restent à mener, ce résultat préliminaire peut être à l'origine d'une rupture technique au niveau de l'utilisation des échantillons biologiques pour l'analyse de l'ADN.

Références du chapitre 5

1. Philo, J. S. & Arakawa, T. Mechanisms of protein aggregation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10,** 348–351 (2009).
2. Invernizzi, G., Papaleo, E., Sabate, R. & Ventura, S. Protein aggregation: Mechanisms and functional consequences. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44,** 1541–1554 (2012).
3. Putnam, F. W. *The Plasma Proteins: Isolation, Characterization, and Function*. (Academic Press, 2014).
4. Eisenberg, D. *et al.* The Structural Biology of Protein Aggregation Diseases: Fundamental Questions and Some Answers. *Acc. Chem. Res.* **39,** 568–575 (2006).
5. Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **426,** 884–890 (2003).
6. Fändrich, M., Fletcher, M. A. & Dobson, C. M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* **410,** 165–166 (2001).
7. Taboada, P., Barbosa, S., Castro, E. & Mosquera, V. Amyloid Fibril Formation and Other Aggregate Species Formed by Human Serum Albumin Association. *J. Phys. Chem. B* **110,** 20733–20736 (2006).
8. Wang, S. *et al.* Self-assembly of plasma protein through disulfide bond breaking and its use as a nanocarrier for lipophilic drugs. *Polym. Chem.* **5,** 4871 (2014).
9. Polson, A., Potgieter, G. M., Largier, J. F., Mears, G. E. F. & Joubert, F. J. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **82,** 463–475 (1964).
10. Atha, D. H. & Ingham, K. C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.* **256,** 12108–12117 (1981).
11. Woiszwillo, J. E. Method for isolating biomolecules from a biological sample with linear polymers. (1996).

12. den Engelsman, J. *et al.* Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development. *Pharm. Res.* **28,** 920–933 (2011).

13. Morgner, F. *et al.* Terbium to Quantum Dot FRET Bioconjugates for Clinical Diagnostics: Influence of Human Plasma on Optical and Assembly Properties. *Sensors* **11,** 9667–9684 (2011).

14. Kurganov, B. I. Kinetics of heat aggregation of proteins. *Biochem. Biokhimiia* **63,** 364–366 (1998).

15. Finn, T. E., Nunez, A. C., Sunde, M. & Easterbrook-Smith, S. B. Serum Albumin Prevents Protein Aggregation and Amyloid Formation and Retains Chaperone-like Activity in the Presence of Physiological Ligands. *J. Biol. Chem.* **287,** 21530–21540 (2012).

Conclusion et perspectives.

A l'heure où les applications biologiques de la génomique sont de plus en plus nombreuses, nous comprenons l'intérêt de développer des outils et des technologies innovantes visant à accélérer l'analyse des informations génétiques. Parallèlement au développement de la génomique, l'essor de la microfluidique ces dernières années a permis d'envisager de nouvelles solutions technologiques en accélérant les opérations de laboratoires en les intégrant dans des dispositifs miniaturisés. Par exemple, le développement de la PCR digitale et de l'électrophorèse sur puce sont de réels succès. En nous plaçant dans cette dynamique, nous pouvons conclure que le développement du système microfluidique µLAS pour la concentration, la séparation et la détection simultanée de l'ADN a un réel potentiel applicatif.

Principaux résultats

Le premier résultat marquant de notre thèse a été l'optimisation des conditions opératoires, notamment de la solution viscoélastique, pour la concentration et la séparation simultanée d'un marqueur de taille commercial entre 100 et 1500 bp. En effet jusqu'à ce moment, la séparation était réalisée en dynamique et plutôt sur des grands fragments d'ADN. Les performances de µLAS – qui seront reprises plus en détails dans le paragraphe suivant – se sont révélées très intéressantes notamment en termes de limites de détection et de vitesse d'analyses. Une contribution attenante a consisté à introduire des puces à double canaux, qui ont rendu possible l'analyse de l'échantillon par comparaison en temps réel avec une référence. Enfin nous avons proposé une stratégie innovante – qui a fait l'objet d'un brevet – pour la détection spécifique de séquences en solution sans étape de lavage ou d'ingénierie élaborée des sondes nucléotidiques.

L'application de µLAS au diagnostic de la maladie de Huntington a montré que la précision de la mesure doit être améliorée pour donner des longueurs de fragments à 3 bases près. Toutefois, notre étude a permis d'établir que la sensibilité de µLAS permet de travailler avec des échantillons peu amplifiés à 20 cycles de PCR, ce qui peut accélérer les procédures et limiter les amplifications non-spécifiques assez fréquentes pour les maladies causées par des expansions trinucléotidiques.

Nous avons également montré que µLAS et sa version industrielle permettent l'analyse de la distribution en taille et en concentration de l'ADN circulant dans le sang, ce qui représente un challenge pour les technologies actuelles. Nous avons également proposé une approche originale qui consiste à réaliser l'analyse avec un minimum de préparation de l'échantillon sanguin, sans procédure d'extraction de l'ADN. Cette approche peut constituer une rupture avec les méthodes pré-analytiques utilisées par les systèmes d'électrophorèses commerciaux. Certains de ces résultats sont rappelés dans la Figure 73, qui a défaut d'être lisible, pourra rappeler des souvenirs au lecteur.

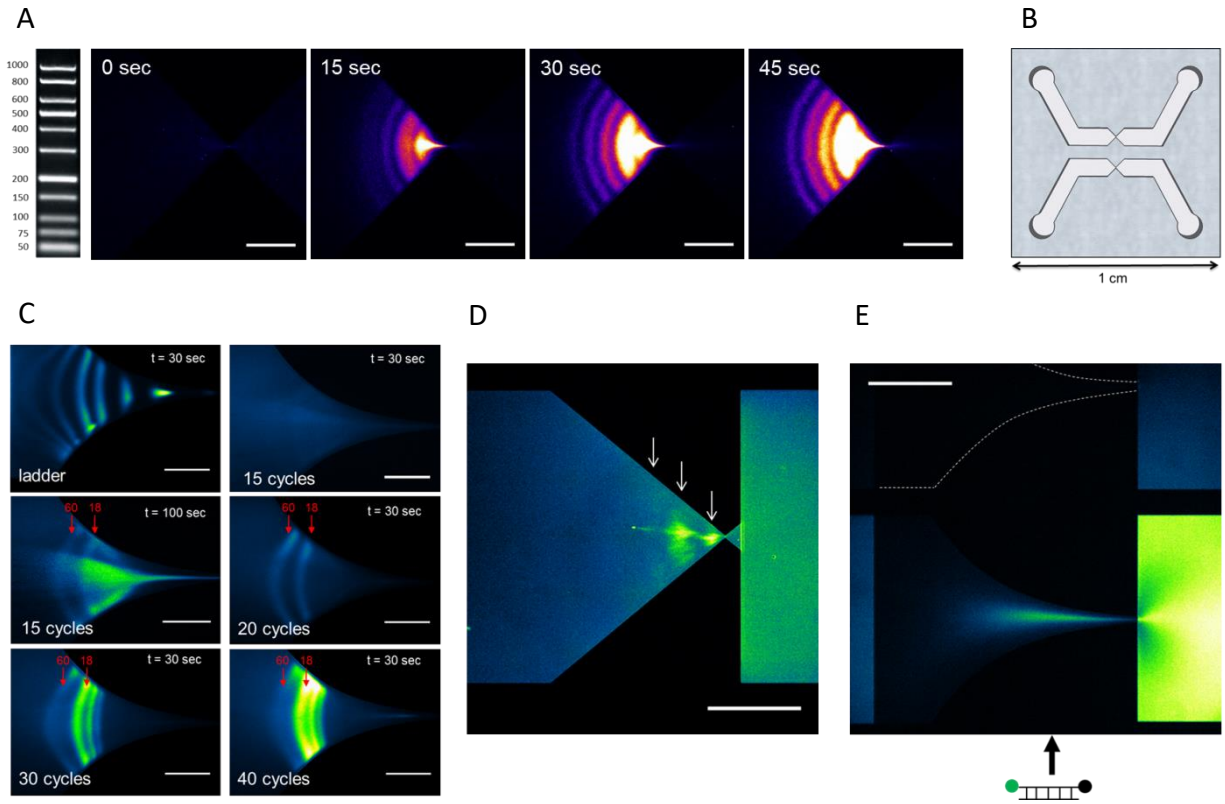


Figure 73. Illustrations représentatives de certains des résultats marquants obtenus pendant notre thèse. A) Concentration sélective d'un 100 bp ladder en 45 secondes. B) Puce à double canaux. C) Suivi de l'apparition de fragments non-spécifiques en fonction du nombre de cycles de PCR. D) Analyse de l'ADN circulant d'un échantillon plasmatique sans étape d'extraction de l'ADN. E) Concentration sélective d'un complexe sonde-cible pour la détection spécifique de séquences.

Comparaison de µLAS avec les systèmes d'électrophorèses commerciaux

Nous avons vu dans le premier chapitre que les systèmes commerciaux d'électrophorèses au format capillaire ou microfluidique sont la référence pour la séparation et l'analyse de l'ADN. Nous tentons de dresser dans la suite une comparaison de nos résultats avec ceux des systèmes commerciaux.

- Le temps de séparation : <1 min, ou <5 min pour les échantillons les plus dilués contre plusieurs dizaines de minutes pour les systèmes commerciaux, avec un temps de préparation de l'échantillon et de la puce d'environ 20 minutes dans tous les cas (Figure 74).

µLAS offre la possibilité d'accélérer significativement les temps d'analyse, un paramètre intéressant pour diminuer les coûts et multiplier le nombre d'analyses. Notons toutefois que la plupart des systèmes commerciaux permettent d'analyser plusieurs dizaines voire centaines d'échantillons simultanément. Pour µLAS, nous avons montré l'utilisation de puces à deux canaux. A priori, rien ne s'oppose à une parallélisation plus importante pour analyser un plus grand nombre d'échantillons simultanément.

- L'intégration des opérations : simultanément dans un même canal contre séquentiellement pour les systèmes commerciaux.

µLAS réalise la concentration sélective de l'ADN dans un simple canal. Ce degré d'intégration permet de gagner du temps et d'avoir un dispositif monolithique et très compact.

- La purification de l'échantillon : moins critique que les systèmes commerciaux qui utilisent des étapes de pré-concentration par « stacking » par exemple.

L'échantillon peut être dilué directement par un facteur 2 au moins dans le tampon viscoélastique. La concentration en sels n'est pas critique pour la concentration sélective. Des échantillons complexes tels que du plasma sanguin peuvent être utilisés sans extraction préalable de l'ADN (ce sujet est abordé dans le chapitre 5 de ce manuscrit).

- La gamme de tailles : 30 bp à 50 kbp.

La concentration sélective est fonctionnelle pour une large gamme de tailles et demande très peu d'optimisations du tampon ou de la géométrie de la puce. La séparation de longs fragments >30 kbp en électrophorèse est généralement très longue et nécessite l'utilisation de champs pulsés.

- La précision de la mesure de taille : >97% contre >90-97% pour les systèmes commerciaux

La précision de la mesure est comparable à celles des électrophorèses commerciales. Pour des fragments de 100 bp, la taille est donnée avec une erreur de 3 bp.

- La précision de la mesure de concentration : >70%.

L'évaluation de la concentration est généralement semi-quantitative pour tous les systèmes de séparation.

- Le facteur de concentration de l'ordre de 750 en une minute.

La vitesse de concentration dépend du débit de transport des molécules. Les performances de concentration sont comparables à celles de la plupart des techniques de concentration décrites dans la littérature et présentées dans le chapitre 1. Notons toutefois que le facteur de concentration dépend de la taille des molécules.

- La limite de détection : <1 ng/mL contre 5 ng/mL pour les systèmes commerciaux les plus sensibles (Figure 74).

La limite de détection est de l'ordre de celles affichées par les systèmes d'électrophorèses dans leur version haute sensibilité. Cette limite de détection, pertinente pour l'analyse de l'ADN résiduel et de l'ADN circulant peut encore être optimisée.

- Le débit : >0,2 µL/min contre plusieurs dizaines de µL/min pour les électrophorèses capillaires.

C'est le point critique de la technologie µLAS, notamment pour l'analyse de l'ADN circulant. Les technologies µfluidiques sont par définition limitées en débit à cause de l'échelle des canalisations utilisées. De plus l'utilisation d'une constriction augmente significativement la résistance hydraulique du canal.

- La consommation d'échantillon : quelques microlitres.

L'avantage d'avoir un faible débit est que la consommation de l'échantillon est très limitée. Notons tout de même qu'il faut suffisamment de solution (~10 µL) pour immerger les électrodes dans les réservoirs pendant toute la durée de l'expérience. Toutefois comme la concentration est rapide, un volume d'échantillon minimal est souvent dilué dans le tampon de séparation (~1 µL d'échantillon dilué dans 100 ou 1000 µL de tampon).

- Le coût de fabrication :

La fabrication des puces nécessite des opérations standard de microfabrication. Toutefois elle est réalisée avec des équipements onéreux en salle blanche. En recherche le coût de fabrication d'une vingtaine de puces (sur un wafer) est d'environ 500 euros. Il est difficile d'évaluer ce coût de revient dans une perspective de production industrielle.

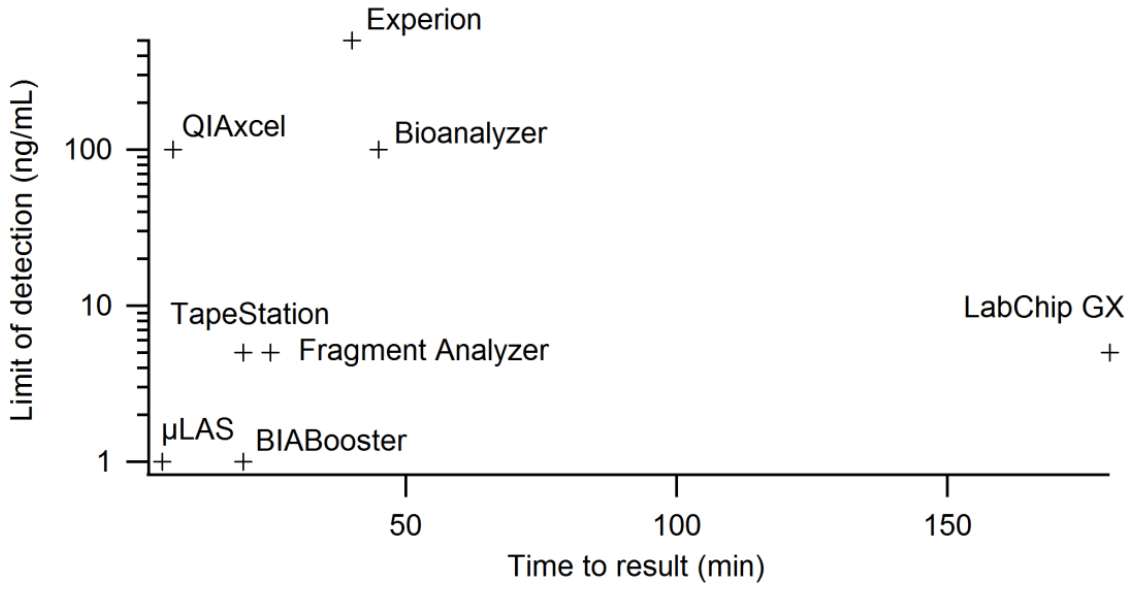


Figure 74. Comparaison des limites de détection en fonction du temps d'analyse de µLAS avec différents systèmes électrophorétiques commerciaux.

Limitations de µLAS

Comme pour la plupart des technologies microfluidiques, le débit d'écoulement peut être un verrou pour l'analyse. C'est particulièrement vrai lorsque l'on cherche à détecter des marqueurs très fortement dilué dans l'échantillon. En effet, dans ce cas de figure, malgré la fonction de concentration, il faut pouvoir traiter des volumes importants pour obtenir suffisamment de cibles et donc de signal pour permettre la détection. Pour µLAS, l'utilisation d'une constriction limite d'autant plus les débits, et augmente les temps d'analyse. C'est particulièrement vrai pour la détection de l'ADN tumoral circulant. Dans le chapitre 2, nous avons montré qu'avec nos designs actuels, nous devions analyser environ 30 µL de sang pour collecter suffisamment de séquences cibles pour la détection, correspondant à un temps d'analyse d'au moins 30 minutes (en ajustant les paramètres d'actuation et le tampon pour atteindre un débit d' 1 µL/min avec nos designs de puce actuels). Ces problématiques de débit peuvent être adressées grâce au format capillaire notamment. Par ailleurs, notons que le format capillaire parait plus adapté pour récupérer des échantillons après concentration.

Il est également intéressant de discuter des limitations du format puce pour la production industrielle. Par exemple, l'utilisation canaux dotés de constrictions est peu standard. Ainsi la fabrication des puces demande des procédés spécifiques relativement coûteux à mettre en place pour de faibles volumes de production.

Par ailleurs nous avons vu que l'utilisation du silicium est limitante pour l'application de champs électriques importants. Ce problème peut être levé avec des puces en verre, ce matériau étant par ailleurs, moins cher en prix d'achat.

Enfin la production d'un appareil commercial, nécessite la mise en place d'équipements dédiés pour l'application de la pression, du champ électrique et l'imagerie et leur intégration en un système unique. Par exemple, pour un système commercial, on préfèrera intégrer un lecteur optique à bas coût, plutôt qu'utiliser un microscope optique, externe, coûteux et volumineux.

Perspectives de développement

Il est évident que les performances de µLAS vont être améliorées. Par exemple, l'optimisation de la géométrie des canaux et des solutions de séparation combinée à un modèle prédictif de la physique de la séparation doit permettre d'améliorer les résolutions de séparation à quelques paires de bases. Ce travail est notamment mené par Bayan Chami pour sa thèse.

La réalisation d'un banc expérimental avec une interface pour piloter les générateurs de pression et de tension ainsi que l'optique doit permettre d'automatiser les manipulations et d'avoir des résultats moins dépendants de l'utilisateur. Par exemple cela nous donnerait la possibilité de reproduire des expériences avec des rampes en tension ou en pression. De plus, ce développement permettra sans aucun doute de gagner du temps sur la mise en place du système et d'accélérer les analyses. Jeffrey Teillet a d'ailleurs commencé une thèse sur ce sujet.

Au niveau de la fabrication, nous réfléchissons à réaliser des puces en verre. Les protocoles sont à mettre en place, mais impliqueraient le collage de deux wafers de verre par l'intermédiaire d'une couche adhésive de résine de type PermiNex 2000 (MicroChem).

Pour accélérer les débits d'écoulement, nous réfléchissons à remplacer la constriction de la largeur du canal par des canaux en pentes. La fabrication de canaux en pentes a été mise en place par Antoine Naillon, un ancien membre de notre équipe et la méthode vient d'être publiée[1] (Figure 75).

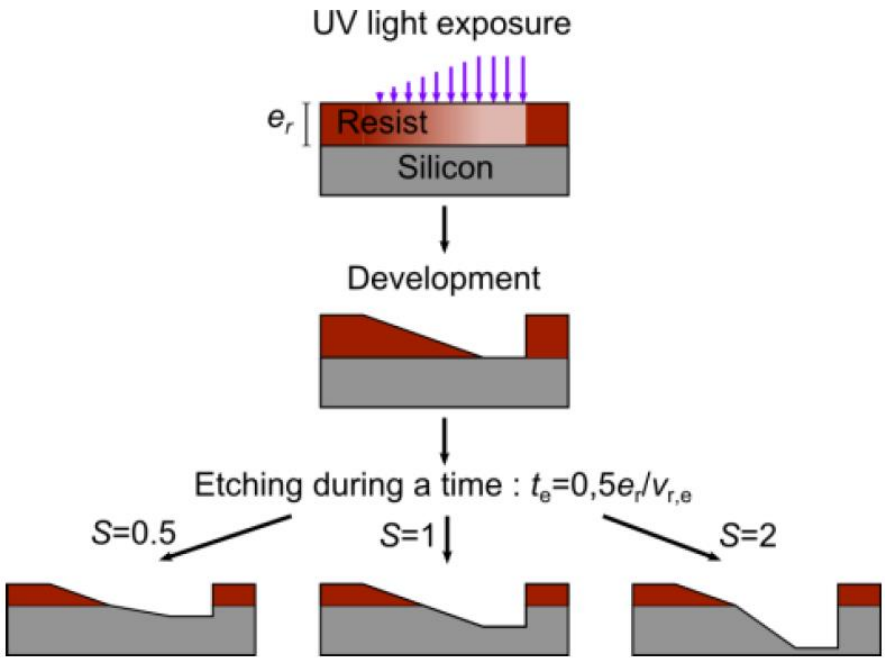


Figure 75. Représentation schématique du procodé de litographie en niveaux de gris pour obtenir des canaux à pentes. Différentes sélectivités de résine donnent différentes profondeurs de canaux. Adapté de Naillon et al.[1].

L'augmentation des débits peut également ouvrir de nouveaux champs applicatifs comme la préparation d'échantillons. En effet, il y a un fort besoin de techniques capables d'enrichir et collecter des fractions de très grands fragments d'ADN en quantités suffisantes pour le séquençage par exemple.

En ce qui concerne l'application au diagnostic de la maladie de Huntington, la collaboration avec l'équipe de Vincent Dion est amenée à se poursuivre. Des expériences complémentaires sur de nouveaux échantillons seront menées par Bayan Chami pour consolider le papier à paraître dans *Nucleic Acids Research*. Par ailleurs, après avoir montré que nous pouvions réduire significativement le nombre de cycles d'amplification, nous aimerions mettre en œuvre l'analyse de fragments générés par la technique CRISPR/Cas9. Cette technique de découpe enzymatique du génome, en pleine expansion, a le potentiel pour révolutionner l'ingénierie génétique[2]. Si l'analyse avec des échantillons Huntington est possible, nous pourrions la généraliser à de nombreuses cibles. On aurait alors un outil pour contrôler la qualité des digestions par CRISPR/Cas9 et une alternative à la génération et l'amplification de séquences par PCR. Une expérience préliminaire a d'ailleurs été menée sur un fragment de 1846 bp de chromosome bactérien digéré par Crispr/Cas9 (Figure 76). Etonnamment, nous avons obtenu un dédoublement de la bande correspondant au fragment d'intérêt (canal du bas), similaire au dédoublement de la bande de 500 bp du kb ladder (canal du haut). L'ADN étant « plaqué » par la force transverse à deux altitudes du canal, nous expliquons ce dédoublement par

une différence de vitesse entre les molécules au niveau de la paroi en verre et celles au niveau du silicium. Ce phénomène peut être atténué par le passage à une puce entièrement fabriquée en verre ou le développement d'un coating de la surface. Toutefois, ce premier résultat ouvre une perspective séduisante pour l'analyse de fragments digérés par Crispr/Cas9 avec la technologie µLAS.

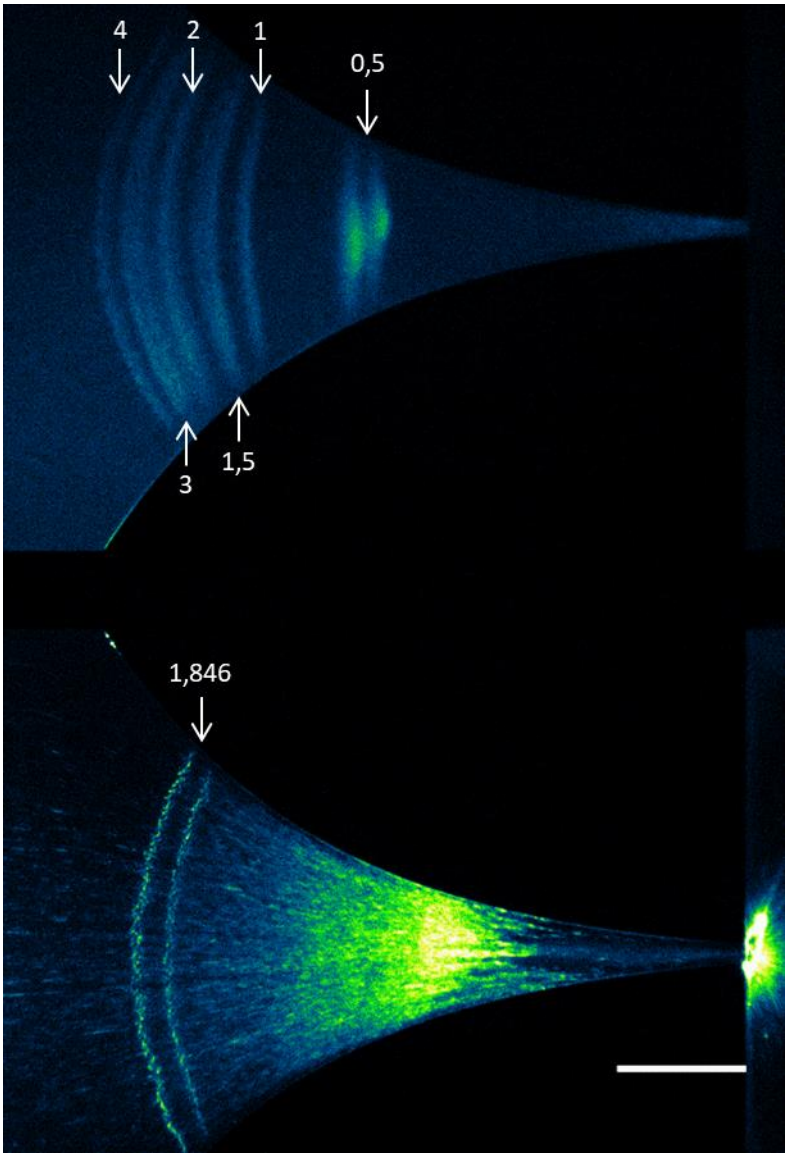


Figure 76. Séparation sur un échantillon de chromosome bactérien digéré par CRISPR/Cas9 (en bas) en comparaison avec kb ladder (en haut). Environ 20 pg/µL de génome bactérien est digéré et dilué dans notre tampon de séparation TBE 1x, PVP (1,3 MDa) à 5%, DTT à 2%, YOPRO-1 à 100 nM. Les conditions de séparation sont 2 bar et 85 V. L'échelle correspond à 150 µM.

Au niveau de l'application ADN circulant, le protocole de préparation pour l'analyse de l'ADN plasmatique sans extraction peut être accéléré, notamment concernant les temps de digestion enzymatiques. Enfin il serait intéressant d'arriver à utiliser la fonction de détection spécifique de

séquence sur des échantillons biologiques dans des concentrations en cibles proches des conditions physiologiques. Un travail sur la spécificité des sondes et de la détection est également à entreprendre, et pourra être optimisé par la mise en place d'un contrôle en température pour le banc expérimental en développement.

Enfin il est important de rappeler qu'en parallèle de µLAS, le développement d'un produit commercial sous format capillaire par Picometrics Technologies est en cours. Il doit permettre de consolider la technologie, de diversifier ses applications et la démocratiser.

1. Naillon, A. *et al.* Quasi-static drainage in a network of nanoslits of non-uniform depth designed by grayscale laser lithography. *Microfluid. Nanofluidics* **21,** (2017).
2. Cinesi, C., Aeschbach, L., Yang, B. & Dion, V. Contracting CAG/CTG repeats using the CRISPR-Cas9 nickase. *Nat. Commun.* **7,** 13272 (2016).

Annexes

A. Fabrication des puces microfluidiques

Les puces microfluidiques sont composées de canaux gravés dans un wafer de silicium encapsulé par un capot de verre. Plusieurs dizaines de puces peuvent être obtenues par wafer. Elles sont fabriquées dans la salle blanche du LAAS qui fournit un environnement contrôlé, et « propre » avec dans certaines zones jusqu'à moins de 100 particules par m^3 de volume d'air.

A.1. Photolithographie optique

La photolitographie est la première étape du process de fabrication. Un wafer de silicium (dopé p, de 4 pouces de diamètre et ~500 µm d'épaisseur) est nettoyé par un traitement piranhas (bain en solution d'eau oxygénée H_2O_2 et acide sulfurique H_2SO_4 à 50/50 en volume) et du HDMS (Hexamethyldisilazane) est vaporisé pour promouvoir l'adhésion de la résine. Une résine positive ECI 3027 est ensuite enduite sur la surface du wafer à graver et durcie par un recuit. L'épaisseur de la couche de résine dépend de la profondeur des canaux à graver (1,3 µm d'épaisseur pour la partie de la constriction contre 2,6 µm pour le reste du canal). La résine est insolée à l'aide d'un masque en verre avec des motifs en chrome qui fonctionne comme un pochoir (Figure). Les zones de la résine positive exposées aux UV (car non protégées par le chrome de masque) sont polymérisées. Après un nouveau recuit, la résine est développée par dissolution des zones non insolées par un solvant. Les zones du wafer à nu correspondent aux motifs qui vont être gravés. Cette technique convient pour obtenir des résolutions de l'ordre du micron.

A.2. Gravure du silicium

L'étape de gravure permet de reporter les motifs exposés dans le silicium. Nous utilisons une gravure RIE (Reactive Ion Etching) pour obtenir des parois droites et un fond sans aspérités. Cette technique de gravure consiste à bombarder la surface du matériau de gaz ionisés. La vitesse de

gravure est différente pour le silicium ou la résine et la gravure est dite sélective. Le temps de gravure est ajusté de manière à obtenir la profondeur de canal désiré tandis que le reste du wafer est protégé par la résine. Deux étapes de photolithographie et de gravure sont nécessaires pour obtenir les deux profondeurs de canal de nos dispositifs (~2 et 15 µm). Les restes de résine sont retirés par nettoyage au plasma O_2 et la profondeur des canaux est vérifiée à l'aide d'un profilomètre mécanique.

A.3. Perçage des puces

L'étape de perçage du silicium permet de créer l'entrée et la sortie du canal qui seront connectées aux réservoirs. Un film sec est laminé sur la surface du wafer pour protéger les motifs des projections. Le perçage est réalisé par sablage. Cette technique consiste à projeter des grains d'oxyde d'aluminium par air comprimé pour traverser l'épaisseur du wafer (~0,5mm) par abrasion, et percer des trous d'environ 1 mm de diamètre. Le film sec est ensuite retiré par dissolution dans un solvant sous sonication.

A.4. Oxydation des puces

L'étape d'oxydation des puces permet d'isoler électriquement les canaux par croissance thermique d'une couche d'oxyde humide (SiO_2) d'environ 400nM à la surface du wafer. L'épaisseur de cette couche est contrôlée par ellipsométrie et la profondeur des canaux n'est pas modifiée car la croissance est homogène sur toute la surface du wafer. Seule la largeur du canal est impactée et peut avoir une incidence au niveau de la constriction notamment.

A.5. Encapsulation des puces

Les canaux sont encapsulés par soudure anodique d'un wafer de verre dopé au sodium de 170 µm d'épaisseur. En appliquant une tension (entre 600 et 800 V) à haute température (370°C), le passage du courant entraine la migration des ions sodium à la surface du verre et la formation de liaisons covalentes (Si-O-Si) entre le verre et le silicium pour sceller les canaux. Après découpage du wafer, les puces microfluidiques sont prêtes à l'emploi.

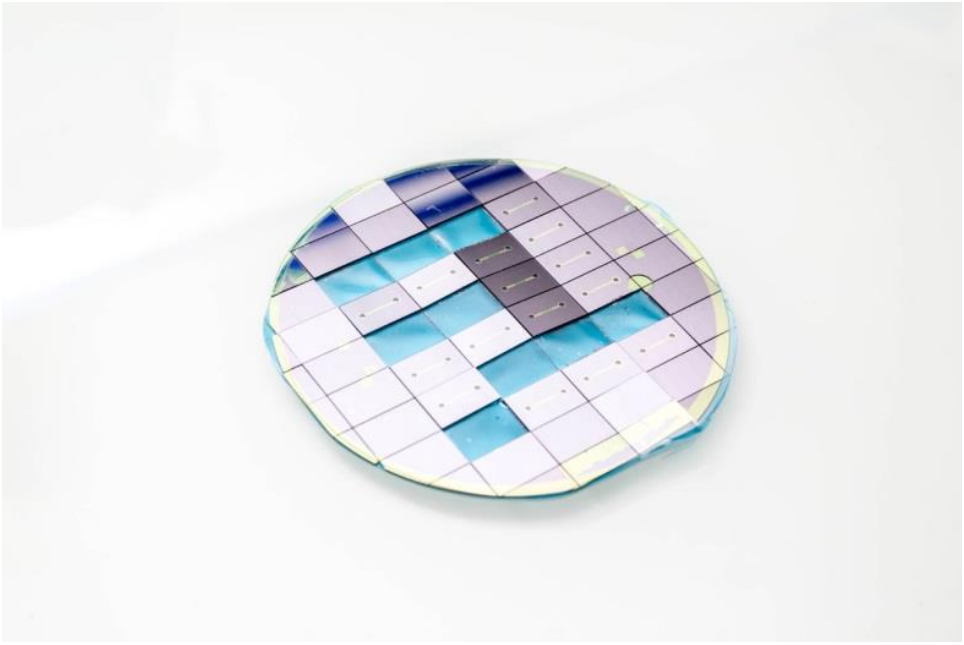


Figure A77. Photographie des puces microfluidiques en sortie de salle blanche.

B. Caractéristiques des différentes puces utilisées pour nos travaux

Il est possible de donner une expression du débit, de la vitesse d'écoulement et du champ électrique pour nos géométries de canaux. Le débit dépend de la résistance hydrodynamique R_H et de la variation de pression ΔP avec $Q = \frac{\Delta P}{R_H}$. Pour calculer les résistances hydrodynamiques dans nos canaux, nous sommes partis de l'expression de la résistance hydrodynamique dans un canal rectangulaire $R_H = \frac{12\mu L}{wh^3}$ (avec L, w et h la longueur, la largeur et la hauteur du canal). Les expressions de la vitesse d'écoulement et du champ électrique sont quant à elle obtenues par conservation du débit et de l'intensité électrique dans le canal.

Tableau A7. Expressions du débit, de la vitesse d'écoulement et du champ électrique le long de l'axe de symétrie du canal pour les différents designs utilisés pour nos travaux. ΔP correspond à la pression en bar, V à la tension en V, d à la distance par rapport à la constriction en µm. H est la hauteur du grand canal, h la hauteur du petit canal, L la largeur du canal, l la largeur de la constriction.

N° de figure	Caractéristiques		Débit (µL/min)	Vitesse d'écoulement (m/s)	Champ électrique (kV/m)
2.12 ; 2.16A ; 2.25 3.8 5.7	**H (µm)**	15	$\frac{0{,}32 \times \Delta P}{\eta}$	$\frac{4 \times \Delta P}{(0{,}99375 \times d + 2)\eta}$	$\frac{130 \times V}{(0{,}99375 \times d + 2)}$
	h (µm)	2			
	L (µm)	800			
	l (µm)	2			
2.16B ; 2.21 ; 2.26 3.9 5.15	**H (µm)**	15	$\frac{\Delta P}{\eta}$	$\frac{12 \times \Delta P}{(1{,}809 \times d + 5)\eta}$	$\frac{735 \times V}{(1{,}809 \times d + 5)}$
	h (µm)	2			
	L (µm)	1000			
	l (µm)	5			
2.17 ; 2.20 ; 2.23 ; 2.24 3.7 5.2	**H (µm)**	15	$\frac{0{,}498 \times \Delta P}{\eta}$	$\frac{2{,}08 \times \Delta P}{(1{,}59 \times d + 5)\eta}$	$\frac{420 \times V}{(1{,}59 \times d + 5)}$
	h (µm)	2			
	L (µm)	1000			

	l (µm)	5			
2.18A	**H (µm)**	15	$\frac{0{,}08 \times \Delta P}{\eta}$	$\frac{\Delta P}{(1{,}55 \times 10^{-6} \times d^3 + 5)\eta}$	$\frac{25.4 \times V}{(1{,}55 \times 10^{-3} \times d^3 + 5)}$
	h (µm)	2			
	L (µm)	800			
	l (µm)	5			
2.18B	**H (µm)**	15	$\frac{0{,}08 \times \Delta P}{\eta}$	$\frac{\Delta P}{(0{,}99375 \times d + 5)\eta}$	$\frac{25.4 \times V}{(0{,}99375 \times d + 5)}$
	h (µm)	2			
	L (µm)	800			
	l (µm)	5			
2.22 3.6	**H (µm)**	15	$\frac{3{,}26 \times \Delta P}{\eta}$	$\frac{20{,}38 \times \Delta P}{(40{,}46 \times exp^{0{,}00376 \times d} - 20)\eta}$	$\frac{240 \times V}{(40{,}46 \times exp^{0{,}00376 \times d} - 20)}$
	h (µm)	4			
	L (µm)	800			
	l (µm)	20			

C. DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids, Lab on a Chip

DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids

Hubert Ranchon[1,2], Rémi Malbec[1,2], Vincent Picot[3], Audrey Boutonnet[3], Pattamon Terrapanich[1,2], Pierre Joseph[1,2], Thierry Leïchlé[1,2], Aurélien Bancaud[1,2]

[1] CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France

[2] Univ de Toulouse, LAAS, F-31400 Toulouse, France

[3] Picometrics Technologies, 478 rue de la Découverte, Miniparc Bât 1, 31670 Labège, France

Correspondence: abancaud@laas.fr

Keywords: DNA separation, DNA enrichment, microfluidics, capillary electrophoresis, viscoelasticity

Abstract

DNA size separation followed by purification and enrichment constitute essential operations for genetic engineering. These processes are mostly carried out using DNA electrophoresis in gels or in polymer solutions, a well-established yet lengthy technique which has been notably improved using Lab-on-Chip technologies. So far innovations for DNA separation or enrichment have been mostly undertaken separately, and we present an approach that allows us to perform these two processes simultaneously for DNA fragments spanning 0.2–50 kilo base pairs (kbp) in length. Our technology involves electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids, in which we show the occurrence of transverse forces oriented toward the walls. These forces increase with DNA molecular weight (MW) and hence induce a progressive reduction in DNA migration speed that triggers size separation in microfluidic channels as well as in capillaries. The separation of MW markers in the range 1-50 kbp is achieved in 15 minutes, thus outperforming gel electrophoresis that takes ~3 hours for this sample. Furthermore the use of a funnel, where electric and flow fields are modulated spatially, enables us to adjust transverse forces so as to stall the motion of DNA molecules at a position where they accumulate at factors of up to 1000 per minute. In this configuration, we establish that the operations of DNA enrichment and separation can be carried out simultaneously for the bands of a DNA MW marker between 0.2-1.5 kbp diluted at 0.02 ng/µL in 30 s. Altogether our technology, which can readily be integrated as an in-line module in Lab-on-Chips, offers unique opportunities for sample preparation and analysis of minute genomic samples.

Introduction

Electrophoretic separation of DNA is a key process of molecular biology, which is used both for preparative and analytical operations. DNA electrophoretic mobility is essentially constant with the size of the molecule in bulk, requiring the use of separation matrices to obtain size-dependent transport properties [1]. Slab hydrogels composed of agarose or poly-acrylamide constitute common separation matrices for table-top separations, and high-performance DNA analysis is carried out in capillaries of ~100 μm in diameter filled with concentrated polymer solutions [2]. The disordered arrangement of polymers constitutes an intrinsic source of dispersion that can be efficiently reduced using artificial matrices composed of regular arrays of micro or nano-posts etched in glass or silicon [3]. The development of these structures constituted a mainstream research orientation for Lab-on-Chip technologies [4], and these researches resulted in exquisite separation performances with continuous [5] or pulsed fields [6]. This success also stimulated the development of novel strategies, including among others "entropic trapping" [7], in which the matrix consists of consecutive deep and shallow trenches etched in silicon that form entropic energy barriers crossed more rapidly by longer chains.

Efforts have been concomitantly devoted to the development of matrix-free separation technologies. Cyclic hydrodynamic and electrophoretic actuation has been shown to induce DNA radial migration towards the walls of capillaries [8]. Due to the dependence in DNA size of transverse migration forces, it has been suggested that this approach was relevant for separation. In fact, improved separation performances have been reported using continuous hydrodynamic flow actuation in confined capillaries of ~5 μm [9,10]. This strategy turned out to be reminiscent of hydrodynamic chromatography [11], in which separation is triggered by steric constraints that repel large molecule from the walls where the flow velocity is faster. Whether steric repulsion or radial migration is invoked, the mechanism of matrix-free separation relies on concentration modulations in the channel cross section. Interestingly concentration variations of spherical tracers [12,13] and DNA [14] could also be detected using viscoelastic fluids flowing in microchannels [15]. Particles accumulate toward the centerline due to transverse viscoelastic forces, which have been characterized both experimentally and theoretically [16,17]. Using numerical analysis for a particle fixed in place by an additional force field, Lee and co-workers noted that (i) cross stream forces could be oriented toward the walls, and (ii) the amplitude of the resulting transverse force would be much higher than for a freely suspended particle [18]. We reasoned that this conjecture could be tested experimentally using electrophoresis continuously acting opposite to the flow direction in order to stall the motion of charged solutes, and hence generate transverse viscoelastic forces oriented toward the walls. Using single particle tracking of nanoparticles or λ-DNA molecules of 50 kbp, we demonstrate that the combination of hydrodynamic and electrophoretic actuations provides an exquisite solution to

monitor the amplitude of viscoelastic forces. We then establish the conditions for high performance DNA separation in microfluidic chips as well as in capillaries with this technology. We finally show that the operations of DNA enrichment and separation can be carried out simultaneously using the spatial modulations of the flow and the electric field in a microfluidic funnel. The overall performances of our technology, as characterized by the concentration enrichment factor of ~10^3 per minute and the separation of a molecular weight DNA marker including fragments ranging from 1 to 48.5 kbp in less than 17 minutes, offer a versatile toolbox for DNA analysis in Lab-on-Chips.

Experimental regime

The viscoelastic fluid was composed of a low conductivity buffer for electrophoresis (2X TBE, see methods) supplemented with variable proportions of poly-vinylpirrolidone (PVP, 360 kDa) spanning 0.1-5% (m:v) filtered at 0.2 µm. PVP was used for its coating properties, which reduce the strength of electroosmotic flow [19], as well as its viscoelastic properties above the entanglement threshold of ~0.7% [20,21]. The concentration of PVP was set to 2% in most experiments. The corresponding viscosity and elastic relaxation time were η~5.5 mPa.s and λ~15 ms, respectively (Supplementary Fig. S1).

We used silicon chips of h=2-10 µm and w=200 µm in height and width, respectively (see details of the fabrication in ref. [22]), or glass capillaries of inner diameter D~10-75 µm (Fig. 1A). The length *L* of the separation channel was 0.5 and 12 cm for microfluidic chips and capillaries, respectively. The electric field *E* was tuned in the range 0.2-5 kV/m, and the maximum flow velocity v_0 spanned 100-3000 µm/s. Inertial forces were negligible because the Reynolds number was in the range of 10^{-5}-10^{-2}. The Deborah number *De*, which measures the product of the fluid relaxation time by the shear rate $\dot{\gamma} \sim v_0/h$~30-300 s^{-1}, was ~0.5-5, implying that the elasticity of the fluid had to be considered to describe the transport of DNA or particles [23].

Qualitative model of cross stream viscoelastic forces

We propose to qualitatively describe the physics of cross stream migration acting on particles or DNA in the context of electrohydrodynamic actuation. We start from the argument of Leshansky and collaborators [12], which postulates that the transverse viscoelastic force is determined by the normal stress difference $N_1=\sigma_{zz}-\sigma_{xx}$ (see Fig. 1A for geometry) For a Maxwell fluid, such as a solution of PVP [15], N_1 is expected to scale with the square of the shear rate, as defined by $\dot{\gamma} \sim \partial v_x / \partial z$. The physical basis of this model is that the excess of elastic energy stored in the polymeric liquid around a particle induces lateral movements toward regions with minimal shearing so as to reduce the elastic energetic penalty.

We then propose to evaluate the spatial dependence of the viscoelastic force by finite element modeling. We consider a charged bead of 100 nm in diameter transported in a microchannel of *h*=4 µm (Fig. 1B). We assume that the effective velocity of a particle is defined as the sum of hydrodynamic and electrophoretic velocities. Disregarding rotational movements of the bead and hydrodynamic interactions, we suggest that (i) Faxen law [24] describes the hydrodynamic component of the effective speed, and (ii) a flat velocity profile along the vertical axis can be used to model electrophoresis (see Methods section). Finally we compute the flow around one particle placed in hydrodynamic or electrohydrodynamic flow fields by solving 2D creeping flow equations with finite element methods (lower panel in Fig. 1B). Upon application of an electric field, the shear rate at the vicinity of the bead is enhanced near the centerline or near the wall (upper panel of Fig. 1B) depending on whether the particle is slowed down or accelerated (blue and green datasets), respectively. Consequently, the amplitude of the electric field modulates the shear around the particle, and so the transverse viscoelastic force. We therefore suggest that the application of an electric field allows us to control the direction and the amplitude of cross stream forces in viscoelastic fluids.

Cross stream forces acting on nanoparticles

We decided to characterize the transport of 200 nm particles conveyed in rectangular channels of *h*=7 µm in height and *w*=300 µm in width filled with a 2% PVP solution. We used wide field velocimetry, and extracted the longitudinal velocity distribution (Fig. 1C). The pressure drop was set so that the peak of the velocity distribution was at ~100 µm/s (green dataset in Fig. 1C), and the corresponding average speed was 83 µm/s. The negative charge of the tracers, which is characterized by a surface potential of -41+/-2 mV (Malvern ZetaSizer), allowed us to combine electrophoresis and hydrodynamics. The electric field was first adjusted to force particle migration at 30 µm/s in the opposite direction to the flow (purple dataset in the inset of Fig. 1C), and the two fields were then actuated simultaneously. The shape of the resulting velocity distribution was flattened (purple dataset in Fig. 1C), and the average speed decreased more rapidly than the linear subtraction of hydrodynamics and electrophoresis from 83 to 43 µm/s. Further, as described in ref. [25], the analysis of the shape of velocity distributions enabled us to measure the particle distribution across the channel height with no adjustable parameter. Focusing toward the channel centerline occurred without electrophoresis (Fig. 1D), in agreement with earlier studies [14], whereas an accumulation of particles towards the walls was detected in the presence of an electric field acting opposite to the flow. These experiments therefore confirmed that the orientation of cross stream forces could be monitored with combined electrophoretic and hydrodynamic actuation.

We then investigated the size dependence of cross stream forces using tracers of 100 and 300 nm co-flowing in a channel of 2.2 µm in height. The particles were identified according to their relative difference intensity (not shown), and the respective velocity distributions were extracted. Without electrophoresis, both velocity distributions were peaked at 140 µm/s, although that of 300 nm particles was expectedly sharper due to their focusing at the centerline. Given that these tracers have similar surface potentials of -40+/-2 mV and hence comparable electrophoretic mobilities (not shown), we assayed the effect of electro-hydrodynamic actuation. A narrowly-peaked velocity distribution was obtained for 300 nm particles, whereas that for 100 nm tracers was flat in comparison (Fig. 1E). The associated concentration profiles indicated the sharp accumulation of 300 nm particles towards the walls (Fig. 1F). In turn this experiment highlighted that the relative difference in mobility between the two types of particles $(v_{300} - v_{100})/v_{300}$ decreased from +18% without electrophoresis to -65% with the electric field, and suggested that the use of electro-hydrodynamic actuation offered an efficient strategy for size separation.

Cross stream forces acting on DNA

We subsequently inquired whether cross stream forces could also be observed with DNA molecules. To this aim, we tracked the motion of fluorescently labeled DNA molecules (~50 kbp). The velocity distribution was recorded in a 2 µm-thick channel at a constant pressure drop of 10 bar/m and for a range of electric fields spanning 0-2.5 kV/m (Fig. 2A). The corresponding mean hydrodynamic velocity was 230 µm/s (yellow histogram in Fig. 2A), and electrophoretic mobility varied from 0 to 60 µm/s, *i.e.* less than 25% of the hydrodynamic flow speed. The consequences of cross stream forces could readily be assessed from the sharp slow down in velocity that was much greater than the linear subtraction of the electrophoretic speed (indicated by colored arrows in Fig. 2A). This trend was similarly detected in the plot of DNA average velocity as a function of the electric field (Fig. 2B), which showed an initial slope 17 times steeper than expected without coupling between hydrodynamics and electrophoresis (dashed lines). Further we wished to directly demonstrate the preferential localization of DNA near the walls. The electric field was adjusted to reach the stagnation point shown in Fig. 2B. We then characterized the vertical position of DNA molecules stopped in the field of view of the microscope by recording a series of stacks separated by 330 nm across a channel of 2 or 12 µm in thickness (Fig. 2C). The average intensity distribution for 20 molecules was characterized by a bi-modal shape (graph in Fig. 2C), confirming the accumulation of DNA near the walls due to viscoelastic transverse forces. Furthermore we noted that the velocity distribution of molecules close to the walls, *i.e.* in the high electric field regime, was narrower than in the absence of electric field (light green *vs*. red histograms in Fig. 2A). This effect was qualitatively coherent with the confinement of DNA at the walls. Indeed Taylor dispersion, which defines the

diffusivity in pressure-driven flows, is proportional to with $v_0^2 h^2$ divided by the diffusion coefficient [26]. Confined molecules only explore a fraction of the channel at a reduced velocity, hence the effective height and velocity with transverse viscoelastic forces that are relevant to estimate Taylor dispersion are smaller than *h* and v_0. In order to quantitatively characterize the reduction in diffusivity, we normalized the breadth of the velocity distribution along the x axis to that obtained in the *y* direction (see Fig. 1A for geometry), in which Brownian diffusion was only contributing to dispersion. This data shown in the inset of Fig. 2B established that the amplitude of fluctuations was reduced by a factor of ~7 with electro-hydrodynamic actuation. Hence our technology appeared to overcome the limitation of Taylor dispersion in pressure-driven flows for microfluidic separation, which has so far met limited success without the use of confined channels [27,28].

Finally we investigated the potential of electrohydrodynamic flows for size-based separation by assaying the behavior of two DNA species of 48.5 and 5.4 kbp (λ-DNA and ϕX174, respectively) simultaneously conveyed in a microchannel of 2 µm. We extracted their respective velocity distributions (Supplementary Fig. S2), and evaluated the relative difference in mobility as a function of the ratio β, which was defined by the electrophoretic velocity divided by the mean flow velocity $2/3v_0$ (Fig. 2D). Without electric field, the migration of λ-DNA was expectedly faster than that of ϕX174 due to the enhancement of viscoelastic focusing toward the channel centerline for high molecular weight molecules, as was reported in ref. [14]. Note however that dispersion was maximal, hence separations were unfavorable, in this regime (see more below). With electrophoresis, the orientation of cross stream forces towards the walls changed the migration order. The maximal difference in mobility between λ-DNA and ϕX174 was ~30% using a low flow velocity of v_0~80 µm/s (red dataset in Fig. 2D), suggesting that actuation parameters could be tuned to enhance the performance of DNA size separation experiments.

DNA size separation

We then focused on DNA separation using three DNA molecular weight (MW) markers conveyed in custom-made microfluidic chips or in capillaries. The main difference between these technologies is associated to the length of the separation channel, which was at least of 12 cm for Agilent Capillary Electrophoresis *vs*. 0.5 cm for our microfluidic devices. Given the sieving properties of PVP for DNA separation [27], we started with conventional electrophoresis carried out in a 10 µm capillary filled with a 2% PVP solution. Most bands of a kb-ladder were resolved in ~50 minutes with an electric field of 3 kV/m (left panel of Fig. 3A). We then optimized electro-hydrodynamic actuation parameters in the same capillary (see Supplementary Fig. S3 for optimization strategy), and resolved the bands of the separation standard in less than 30 minutes (middle panel of Fig. 3A). The resolution

of the separation in viscoelastic fluids between the 0.5 and 10 kb fragments was enhanced, 28.0 using electro-hydrodynamics *vs*. 17.8 with electrophoresis (see Methods for definition). Further, according to our model of separation based on transverse viscoelastic forces, these experiments could be carried out in channels with minimal confinement, e.g. in a capillary of inner diameter *D*~75 µm. Indeed the bands comprised between 1 and 48.5 kbp were resolved in less than 17 minutes with electro-hydrodynamic actuation (right panel of Fig. 3A). Given the run time of 3 hours reported by the supplier for the separation of this MW marker in slab gels, this result proved the performance of our technology.

We subsequently investigated the separation mechanism in microfluidic chips of 2 µm in thickness. The pressure was set at 10, 25, and 150 bar/m in order to resolve DNA bands in the range 0.5-10 kb (Fig. 3B). Optimal results were obtained for a mean flow velocity of 220 µm/s and an electrophoretic mobility of 45 µm/s, allowing us to complete the separation in ~7 minutes (middle panel of Fig. 3B). Furthermore the modulation of the flow rate towards high or low velocities enabled us to improve the resolution of the separation for high or low molecular weight (MW) molecules, respectively (right and left panels of Fig. 3B). Using a low flow rate (purple curve, right panel in Fig. 3B), the cross flow migration force was insufficient to modulate the velocity of molecules shorter than ~2 kb, which reached the detector in a single peak characterized by a speed roughly equal to the linear combination of hydrodynamics and electrophoresis (not shown). In order to recapitulate the three experiments in Fig. 3B, we computed the ratio of DNA speed to the mean flow velocity as a function of MW (Fig. 3C). For each condition, we observed a monotonic decrease in DNA speed, which was associated to the onset of transverse forces with DNA size. The three curves also exhibited a sharp mobility decrease in a size range that could be tuned by adjusting the pressure drop and the electric field. Hence, the modulation of transverse forces in electro-hydrodynamic separation provided an efficient solution for DNA size analysis. Furthermore we checked that transverse forces were predominantly determined by the shear rate by plotting the results obtained in 10 µm capillaries (middle panel of Fig. 3A) at the same shear rate of ~110 s^{-1}, which were nearly coincident with the data obtained in microfluidic chips (dashed and black curves in Fig. 3C). Altogether this set of data confirmed the relevance of electro-hydrodynamic actuation for DNA separation in the size range 0.5-50 kbp.

Finally we evaluated the performance of our separation strategy by plotting (i) DNA velocity and (ii) the theoretical plate number per meter *N* [29] as a function of MW (see Methods for definition, Fig. 3D-E). The first plot showed the weak variation of DNA electrophoretic mobility (red dataset in Fig. 3D) in comparison to the responses obtained with electro-hydrodynamic actuation. The typical scaling exponent of ~-2 (dashed line) was in fact much more favorable for separation than that of conventional electrophoresis of -1 [1]. In turn this result explained that the bands of a kb ladder could

be resolved in a chip with a separation channel of only 0.5 cm. We subsequently estimated *N*, which spanned 10^3-7.10^5 and appeared to be slightly smaller than with electrophoresis (red dataset in Fig. 3E). Optimal results of N~2.10^6 obtained with electrophoresis in Lab-on-Chips [30,31] confirmed this trend that the peaks of our separations were broader for a given separation time that those obtained with electrophoresis. We explained this result by the residual band broadening associated to Taylor dispersion near the walls of electro-hydrodynamic actuation (see e.g. inset of Fig. 2B). Notably this interpretation was supported by the low values of *N* obtained in capillaries (lower blue dataset in Fig. 3E): the overly long separation channel was associated to prolonged run times, hence with more dispersion of the peaks. Consequently, the key feature of our technology lies in the exquisite variations of DNA velocity with its MW, which are partly balanced by band broadening effects associated to hydrodynamic actuation.

Simultaneous separation and enrichment

Finally we hypothesized that electro-hydrodynamic actuation could be used to enrich DNA in a funnel. According to conservation laws, the electric and flow fields increase proportionally in a constriction except at the vicinity of the apex (Fig. 4A). In the parameter space (E,v_0), the trajectory of DNA molecules located at the center of the channel (black arrow in Fig. 4A) follows a line starting from low values of (E,v_0), *i.e.* near the origin (Fig. 4B). Using a set of actuation parameters appropriately defined, the migration regime is dominated by hydrodynamics far from the funnel, so that transport ahead of the funnel is oriented towards this structure. As the molecule progresses toward the apex, the flow velocity increases and transverse viscoelastic forces build-up, leading to the progressive decrease of its effective velocity until it reaches the stagnation point where electrophoretic and hydrodynamic forces balance (red circle in Fig. 4B). Past this position, conversely, DNA transport is forced by electrophoresis and oriented backwards to the stagnation point, therefore defining a region in which DNA enrichment occurs. Furthermore the enhancement of viscoelastic forces with DNA MW is expected to lead to size dependent stagnation positions, allowing us to perform separation and enrichment operations simultaneously. Note that this approach is reminiscent of controlled recirculating flows for particle pre-concentration [32], in which enrichment has been achieved using bidirectional hydrodynamic and electro-osmotic flows in a constriction. This study has however been carried out with Newtonian fluids only and DNA concentration has not been reported.

To validate this hypothesis, we conveyed the 100 bp ladder in a funnel of 2 µm in thickness. An onset in fluorescence intensity was detected after 30 seconds (Fig. 4C), and three bands could be isolated together with a broad unresolved pattern at the constriction. Assigning the pressure drop and the electric field to lower or higher intensities allowed us to resolve 2 or 5 bands, respectively

(left and middle panel of Fig. 4D, Supplementary video S1). Given that the conditions to reach the stagnation position require increasingly high electric and pressure fields for low MW molecules (Supplementary Fig. S4), we concluded that the high molecular weight bands of 1500, 1000 and 800 bp were resolved in Fig. 4C. In order to detect 8 bands out of 9 of the 100 bp ladder, we used a shallower funnel of 1 µm and higher PVP concentrations of 4% with 7 bars of pressure difference (right panel of Fig. 4D). Size separation was achieved in ~30 s (Supplementary video S2) and DNA enrichment by a factor of ~50 per minute was detected for the 300 bp lane for an initial DNA concentration of 0.03 ng/µL (Supplementary Fig. S4). Focusing on enrichment kinetics, we measured the total fluorescence over time for the bands of 1500, 1000 and 800 bp highlighted in Figure 4C, and deduced that the enrichment rate of 12-, 30-, and 42-fold per minute (left panel of Fig. 4E) was uncorrelated with the concentration of each lane of 13.5, 16.5, and 25 ng/µL, respectively. We suggest that this discrepancy was associated to the difference in effective velocity between the different DNA species during their transport ahead of the constriction. Bearing in mind that the concentration factor was size dependent, we focused on the optimization of this parameter by tuning the pressure and the electric field (right panel of Fig. 4E) and reached enrichment rates of 10^3 per minute (Supplementary Fig. S4). We wished to compare these results to those obtained with electrokinetic trapping, in which electroosmosis and electrophoresis act in opposition for DNA concentration[33,34], or with dielectrophoretic trapping of molecules in electric field gradients [35,36]. While enrichment factors of 60-fold per minute have been achieved with the former method, state-of-the-art concentration rates of more than 10^5 per minute were reported in nanofabricated structures [35]. Therefore, our technology, which, to the best of our knowledge, has a unique potential for simultaneous separation and concentration operations, compares favorably with electrokinetic trapping, but does not compete with the performances of dielectrophoresis. However, this disadvantage is compensated for by the simplicity of the fabrication process that only involves one step of photolithography. Altogether, we have demonstrated that electro-hydrodynamic actuation offers unique perspectives to simultaneously complete the operations of DNA enrichment and separation on a chip.

Conclusion

We have established the conditions for DNA separation and enrichment in electro-hydrodynamic bi-directional viscoelastic flows. Transverse forces oriented towards the walls constitute the driving mechanism of DNA manipulation. Our strategy therefore appears to be reminiscent of free flow fractionation (FFF) techniques, in which separation in a Poiseuille flow is achieved through cross stream forces [37]. In contrast to FFF, however, transverse forces are induced by co-linear

hydrodynamic and electric fields, and their amplitude can readily be monitored with conventional fluidic actuation technologies. In addition the viscoelastic solution, which is composed of the cheap, biocompatible, and broadly accessible synthetic polymer PVP, is characterized by a moderate viscosity that is compatible with fluid manipulation in Lab-on-Chips. Our technology hence presents an opportunity for a variety of developments in genomic analysis in miniaturized systems. Future improvements of separation and/or enrichment performances may be achieved by investigating the relationship between the resolution of separations and the fluid viscoelastic properties. Indeed, the fluid characteristics can be monitored by tuning the molecular weight and/or the concentration of dissolved polymers, e.g. PVP or poly-ethyleneoxyde, in order to modulate the amplitude of transverse migration forces. More generally, the conception of a model of DNA transport, in which the fluid properties, the geometry of the channel and the actuation parameters are determined for high-performance DNA separation and enrichment, is highly desirable to consolidate our technology. With these guidelines, the separation and enrichment of other biomolecules, such as proteins or RNA strands, may be investigated experimentally in purified conditions, and maybe also in complex media, such as blood or plasma.

Methods

Chemicals and reagents

Molecular biology grades chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France). The buffer for our experiments was TBE 2X (Tris-HCl 160 mM, boric acid 160 mM, EDTA 5 mM, pH = 8.3). Fluorescent nanoparticles were obtained from BangsLabs (Polysciences). Their Zeta potential was measured with the Malvern ZetaSizer. We used four different DNA ladders (Supplementary Fig. S3), namely ExactLadder DNA PreMix 100 bp Plus (Ozyme) for enrichment experiments, and 100 bp & 1 kb DNA ladder (NEB) or 1 kb Extend DNA Ladder (NEB) for size separation, as well as Lambda DNA and the linearized plasmid ϕX174 supplied from NEB. DNA concentration was set to 10 ng/µL in separation experiments, 0.5 ng/µL in enrichment experiments, and 0.5 ng/µL for single particle tracking. The fluorophore YOYO-1 was purchased from Thermofisher, and used at a (DNA:YOYO-1) staining ratio of 10:1. 2% Dithiothreitol was added to the buffer for single molecule imaging in order to reduce photocleavage.

Imaging set-up and electrophoregrams

Imaging was performed with a Zeiss epifluorescence microscope equipped with the 38HE filter set, and with a Lumencor Light Engine emitting at 475 nm with a bandwidth of 28 nm. For single particle tracking experiments with DNA or nanoparticles at a volume fraction of 10^{-5}, we used a 100X or 20X objective with numerical apertures of 1.4 and 0.75, respectively. An ANDOR iXon-885 camera was used with a binning of 2*2. Pressure was monitored with a MFCS controller (Fluigent, Paris) delivering up to 1 or 7 bars, and electric fields were controlled with 300 V DC supplier. Capillary electrophoresis was carried out with 7100 Capillary Electrophoresis system (Germany) equipped with a Zetalif LED 480nm detector (Picometrics Technologies, France). Capillaries of different diameters were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, US). YOYO-1 labeled DNA injection (10 ng/µL) was carried out during 5 seconds at an electric field of 30 kV/m in the sample reservoir. Electrophoregrams were obtained by recording intensity temporal evolution at a distance of 12 cm from the inlet.

For experiments in microfluidic chips, we recorded time series and analyzed images following two different strategies. On the one hand, DNA or particles were isolated by intensity-based segmentation performed in ImageJ. Trajectories were subsequently reconstructed using Particle Point Analysis in *Matlab* (MATWORKS), and velocity distributions were extracted, as described in ref. [25]. In order to monitor the distribution of λ-DNA molecules across the channel height in Fig. 2C, we measured the fluorescence intensity of single molecules in the consecutive stacks along the z-direction and then averaged the signal. On the other hand, intensity measurements were carried out to extract electrophoregrams. Enrichment factors (*EF*) for individual bands in the funnel were also computed by measuring the total intensity in one band *I(t)* at each time point normalized by:

$$EF(t) = \frac{I(t) - I_{BG}}{I_0 - I_{BG}} \qquad (1)$$

with I_0, and I_{BG} the initial intensity of the band and the background signal for buffer flowing in the chip, respectively.

Analysis of separation experiments

The performance of separations was evaluated by measuring the separation time t_{DNA} and the peak width at half maximum w_{DNA} for each peak of electrophoregrams, and we evaluated the theoretical plate number per meter:

$$N = 5.545 \times \left(\frac{t_{DNA}}{w_{DNA}}\right)^2 / l_{sep} \qquad (2)$$

with l_{sep} the length of the separation channel. The resolution of the separation between specie 1 and and 2 was defined by:

$$Res = \frac{t_{DNA}^1 - t_{DNA}^2}{w_{DNA}^1 + w_{DNA}^2} \quad (3)$$

ODE modeling

Using COMSOL, we solved creeping flow equations in 2D with a particle conveyed by a flow field and an electric field. The bead effective velocity was assumed to be the linear combination of Faxen law and electrophoresis, according to:

$$v(z) = 4v_0 \left\{ \left(\frac{z}{h}\right)^2 - \frac{1}{4} + \frac{1}{3}\left(\frac{a}{h}\right)^2 \right\} - v_E \quad (4)$$

with a the radius of the particle and v_E the electrophoretic velocity.

Acknowledgments: We thank F. Ginot and L. Saias for critical reading of the manuscript, and B. Lonetti for technical help in rheological measurements. H.R. thanks the French ministry of Research for funding. This work was partially funded by Toulouse Tech Transfer program µLAS, and by the ANR projet JC08_341867. This work was also supported by the LAAS-CNRS technology platform, a member of the French Basic Technology Research Network.

Contributions: H.R., R.M. V.P., A.Bo., P.T., A.Ba. performed the experiments; P.J., T.L., A.Ba. wrote the manuscript text, prepared the figures, and reviewed the manuscript.

Competing interests V.P. and A.Bo. declare competing financial interests.

1. Viovy, J. L. Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical machanisms. *Rev Mod Phys* **72,** 813–872 (2000).
2. Albarghouthi, M. N. & Barron, A. E. Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21,** 4096–4111 (2000).
3. Volkmuth, W. D. & Austin, R. H. DNA electrophoresis in microlithographic arrays. *Nature* **358,** 600–602 (1992).
4. Dorfman, K. D. DNA electrophoresis in microfabricated devices. *Rev. Mod. Phys.* **82,** 2903–2947 (2010).
5. Kaji, N. *et al.* Separation of long DNA molecules by quartz nanopillar chips under a direct current electric field. *Anal Chem* **76,** 15–22 (2004).
6. Bakajin, O. *et al.* Separation of 100-Kilobase DNA Molecules in 10 Seconds. *Anal Chem* **73,** 6053–6056 (2001).
7. Han, J. & Craighead, H. G. Separation of Long DNA Molecules in a Microfabricated Entropic Trap Array. *Science* **288,** 1026–1029 (2000).
8. Zheng, J. & Yeung, E. S. Mechanism for the Separation of Large Molecules Based on Radial Migration in Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* **75,** 3675–3680 (2002).
9. Liu, K. J., Rane, T. D., Zhang, Y. & Wang, T.-H. Single-Molecule Analysis Enables Free Solution Hydrodynamic Separation Using Yoctomole Levels of DNA. *JACS* **133,** 6898–6901 (2012).
10. Wang, X. *et al.* Free solution hydrodynamic separation of DNA fragments from 75 to 106,000 base pairs in a single run. *J Am Chem Soc* **132,** 40–41 (2010).
11. Tijssen, R., Bos, J. & Van Kreveld, M. E. Hydrodynamic chromatography of macromolecules in open microcapillary tubes. *Anal. Chem.* **58,** 3036–3044 (1986).
12. Leshansky, A. M., Bransky, A., Korin, N. & Dinnar, U. Tunable Nonlinear Viscoelastic 'Focusing' in a Microfluidic Device. *Phys Rev Lett* **98,** 234501 (2007).
13. Del Giudice, F. *et al.* Particle alignment in a viscoelastic liquid flowing in a square-shaped microchannel. *Lab. Chip* **13,** 4263 (2013).

14. Seo, K. W., Byeon, H. J., Huh, H. K. & Lee, S. J. Particle migration and single-line particle focusing in microscale pipe flow of viscoelastic fluids. *RSC Adv.* **4,** 3512–3520 (2014).

15. D'Avino, G. & Maffettone, P. L. Particle dynamics in viscoelastic liquids. *J. Non-Newton. Fluid Mech.* **215,** 80–104 (2015).

16. Villone, M. M., D'Avino, G., Hulsen, M. A., Greco, F. & Maffettone, P. L. Particle motion in square channel flow of a viscoelastic liquid: Migration vs. secondary flows. *J Non-Newton Fluid Mech* **195,** 1–8 (2013).

17. Romeo, G., D'Avino, G., Greco, F., Nettia, P. A. & Maffettone, P. L. Viscoelastic flow-focusing in microchannels: scaling properties of the particle radial distributions. *Lab Chip* **13,** 2802–2807 (2013).

18. Lee, E. F., Koch, D. L. & Joo, Y. L. Cross-stream forces and velocities of fixed and freely suspended particles in viscoelastic Poiseuille flow: Perturbation and numerical analyses. *J. Non-Newton. Fluid Mech.* **165,** 1309–1327 (2010).

19. Milanova, D., Chambers, R. D., Bahga, S. S. & Santiago, J. G. Effect of PVP on the electroosmotic mobility of wet-etched glass microchannels. *Electrophoresis* **33,** 3259–3262 (2012).

20. Knappe, P., Bienert, R., Weidner, S. & Thünemann, A. F. Characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolindone)s with broad size distributions. *Polymer* **51,** 1723–1727 (2010).

21. D'Avino, G. *et al.* Single line particle focusing induced by viscoelasticity of the suspending liquid: theory, experiments and simulations to design a micropipe flow-focuser. *Lab Chip* **12,** 1638–1645 (2012).

22. Viero, Y. *et al.* Efficient prototyping of large-scale pdms and silicon nanofluidic devices using pdms-based phase shift lithography. *Microfluid. Nanofluidics* **12,** 465–473 (2012).

23. Bird, R. B. & Wiest, J. M. Constitutive equations for polymeric liquids. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **27,** 169–193 (1995).

24. Happel, J. & Brenner, H. *Low Reynolds Number Hydrodynamics: with Special Applications to Particulate Media*. (Kluwer, 1983).

25. Ranchon, H., Picot, V. & Bancaud, A. Metrology of confined flows using wide field nanoparticle velocimetry. *Sci. Rep.* **5,** 10128 (2015).

26. Taylor, G. I. Dispersion of solute matter in solvant flowing slowly through a tube. *Proc R Soc Lond.* **A219,** 186–203 (1953).

27. Stein, D., van der Heyden, F. H. J., Koopmans, W. J. A. & Dekker, C. Pressure-driven transport of confined DNA polymers in fluidic channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **103,** 15853–15858 (2006).

28. Wang, X. *et al.* Resolving DNA in free solution. *TrAC Trends Anal. Chem.* **35,** 122–134 (2012).

29. Ettre, L. S. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure Appl. Chem.* **65,** (1993).

30. Gao, Q. & Yeung, E. S. A Matrix for DNA Separation: Genotyping and Sequencing Using Poly(vinylpyrrolidone) Solution in Uncoated Capillaries. *Anal. Chem.* **70,** 1382–1388 (1998).

31. Rahong, S. *et al.* Three-dimensional Nanowire Structures for Ultra-Fast Separation of DNA, Protein and RNA Molecules. *Sci. Rep.* **5,** 10584 (2015).

32. Lettieri, G.-L., Dodge, A., Boer, G., Rooij, N. F. de & Verpoorte, E. A novel microfluidic concept for bioanalysis using freely moving beads trapped in recirculating flows. *Lab. Chip* **3,** 34–39 (2003).

33. Dai, J., Ito, T., Sun, L. & Crooks, R. M. Electrokinetic Trapping and Concentration Enrichment of DNA in a Microfluidic Channel. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 13026–13027 (2003).

34. Stein, D. *et al.* Electrokinetic Concentration of DNA Polymers in Nanofluidic Channels. *Nano Lett.* **10,** 765–772 (2010).

35. Liao, K.-T. & Chou, C.-F. Nanoscale Molecular Traps and Dams for Ultrafast Protein Enrichment in High-Conductivity Buffers. *J. Am. Chem. Soc.* **134,** 8742–8745 (2012).

36. Chou, C.-F. *et al.* Electrodeless Dielectrophoresis of Single- and Double-Stranded DNA. *Biophys. J.* **83,** 2170–2179 (2002).

37. Giddings, J. C., Yang, F. J. & Myers, M. N. Flow Field-Flow Fractionation: a versatile new separation method. *Science* **193,** 1244–1245 (1976).

Figure 1: Transverse migration of nanoparticles in viscoelastic fluids. (A) Representation of the experiment, in which DNA transport is simultaneously actuated with hydrodynamics and electrophoresis. **(B)** In the lower panel, the plot represents the flow field around a 100 nm particle transported by a Poiseuille flow of maximum velocity v_0=100 µm/s in a 4 µm-thick channel (black dataset obtained from finite element modeling). The particle represented by a circle is placed at an arbitrary position midway through the wall and the centerline. Upon application of an electric field that conveys the particle at +/-20 µm/s, the shear stress around the particle is enhanced on the side facing the wall or the centerline, depending on whether the particle is accelerated or slowed down (upper panel). **(C)** The three histograms represent the velocity distribution of 200 nm tracers transported in 7 µm-thick channels with hydrodynamic (green dataset) or electro-hydrodynamic actuation (cyan and purple datasets). The corresponding histograms in the inset represent the velocity distributions for electrophoretically-driven nanoparticles. Note that the Gaussian shape of the distributions with electrophoresis vs. the skewed curve detected for electro-hydrodynamics. **(D)** The three curves represent the spatial distribution of tracers across the channel height for the same conditions as in panel **(C)**. **(E)** The graph shows the behavior of 100 nm and 300 nm tracers (smooth or cityscape plots, respectively) transported in microchannels of 2.2 µm in height with hydrodynamics or electrohydrodynamics (black and green datasets, respectively). **(F)** The spatial distribution of tracers across the channel height indicates the stronger accumulation of 300 nm beads towards the walls for the same set of actuation parameters.

Figure 2: Transverse migration of DNA in viscoelastic fluids. (A) In the left panel, the graph shows the velocity distributions obtained for λ-DNA molecules flowing in 2 µm-thick microchannels for a constant pressure drop and electric fields of variable amplitudes. The electrophoretic mobility is represented by the set of arrows in the inset. **(B)**The plot represents the average velocity of λ-DNA as a function of the electric field. The stagnation point corresponds to the conditions in which hydrodynamic and electrophoretic forces are in balance and the velocity of the molecules is null. The lower and upper dashed lines correspond to the initial variation in velocity vs. that expected for a constant hydrodynamic transport and an electrophoretic mobility of 2.5 10^{-4} cm^2/V.s, respectively. The inset shows the ratio of the standard deviation of the velocity distribution in the longitudinal vs. lateral direction as a function of the electric field. **(C)** In a chip of 12 µm in height, the position of λ-DNA molecules arrested in the field of view of the objective is measured using a series of stacks (3 representative images are shown at the top). The graph below represents the average intensity distribution for 20 molecules, which appear to be predominantly located at the walls of the channel.

(D) The relative mobility difference between λ-DNA and ϕX174 molecules, as inferred from single particle tracking, is plotted as a function of the electric field normalized to the mean flow velocity.

Figure 3: DNA separation using electro-hydrodynamic actuation. (A) The curves in the left and in the middle report electrophoregrams obtained for the separation of a kb-ladder by electrophoresis alone or electrohydrodynamic actuation, respectively, using capillary electrophoresis in 10 µm tubings. The electrophoregram in the right shows the separation of kb-extend DNA ladder by electrohydrodynamic actuation in 75 µm capillary. **(B)** The three graphs show electrophoregrams recorded in 2 µm-thick microchannels under different actuation conditions, as indicated in inset. Note that the curve in the left is obtained with the 100-bp ladder and the others with the kb-ladder. **(C)** The plot represents DNA velocity normalized to the maximum flow velocity v_0 of 0.9, 0.22, and 0.58 mm/s as a function of DNA MW (purple, black, and green datasets, respectively). Note the correspondence of the colors with the electrophoregrams in **(B)**. The dashed curve corresponds to the result of capillary electrophoresis (graph in the middle of **(A)**). **(D)** The graph recapitulates the variation of the velocity as a function of MW for all the electrophoregrams shown in **(A)** and **(B)**. **(E)** The theoretical plate number per meter is reported as a function of DNA MW for different experimental conditions, namely electrophoresis (red curve), electrohydrodynamic actuation in chips or capillaries (dashed and blue curves, respectively).

Figure 4: DNA enrichment and separation in a funnel. (A) In the left panel, the amplitude of the electric and flow fields are predicted by 3D finite element modeling (upper and lower graphs). The electron micrograph in the right represents the funnel just before sealing **(B)** The graph depicts our strategy for a molecule transported along a streamline in the middle of the channel (fire colored line in (A)). Starting from low electric and flow fields, the molecule travels to regions where mechanical constraints are high, as indicated by the arrow, until its velocity becomes null (circle). **(C)** The time series shows DNA enrichment and band formation in a funnel for a set of values in pressure and electrophoretic forces. **(D)** The four micrographs correspond to the result of enrichment experiments after 30 seconds for different actuation parameters indicated in the inset. The channel depth is 2 µm for the three images at the left and 1 µm for the micrograph in the right. **(E)** The plots represent the build-up in intensity over time for different bands and a given set of actuation parameters, or the same band with different actuation parameters (left or right panel, respectively). Note that the signal decreases to zero as soon as the electric field is stopped, as shown by the sudden drop in intensity after 40 s in the right panel.

Figure 1 Ranchon et al., 2015

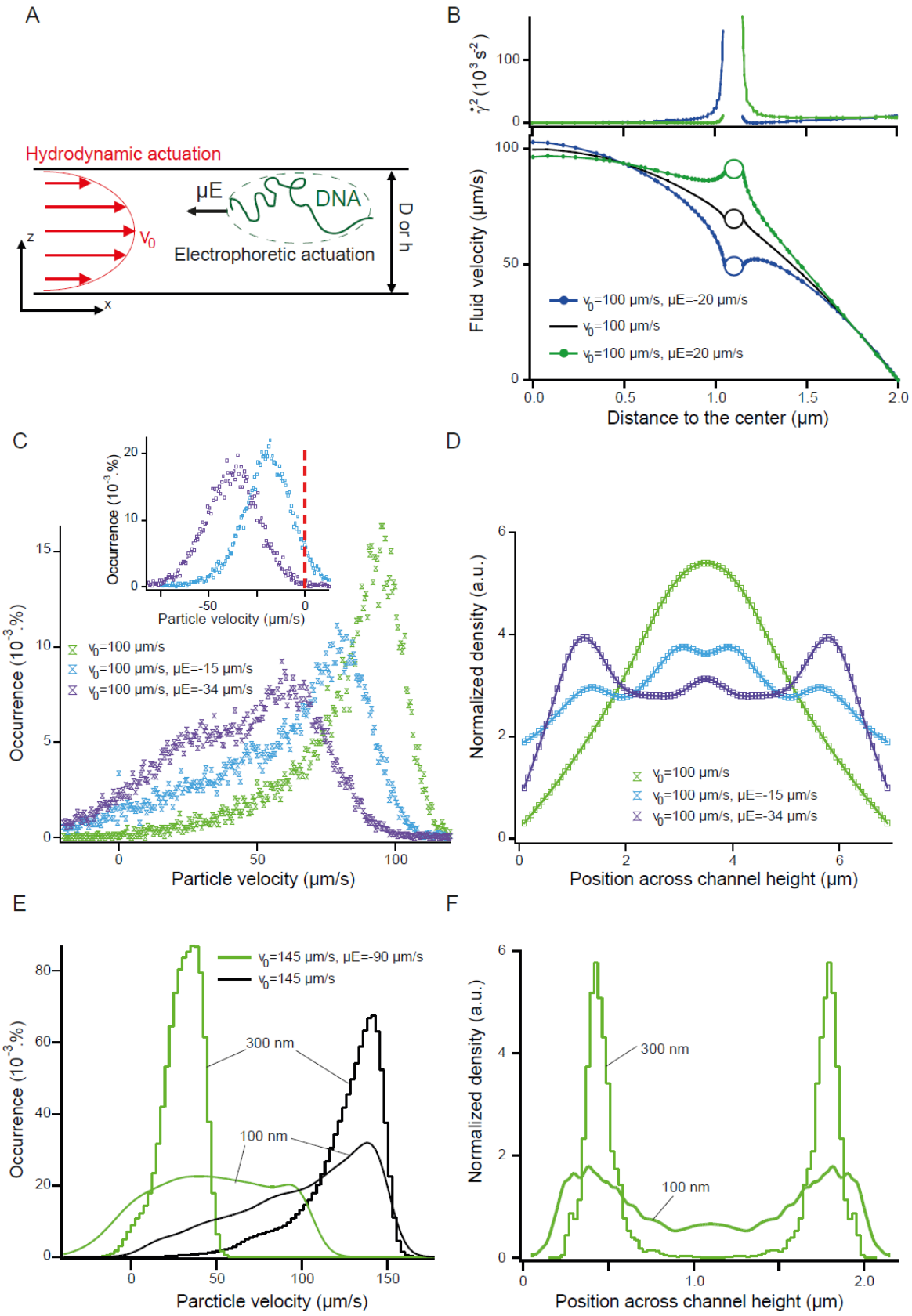


Figure 2 Ranchon et al., 2015

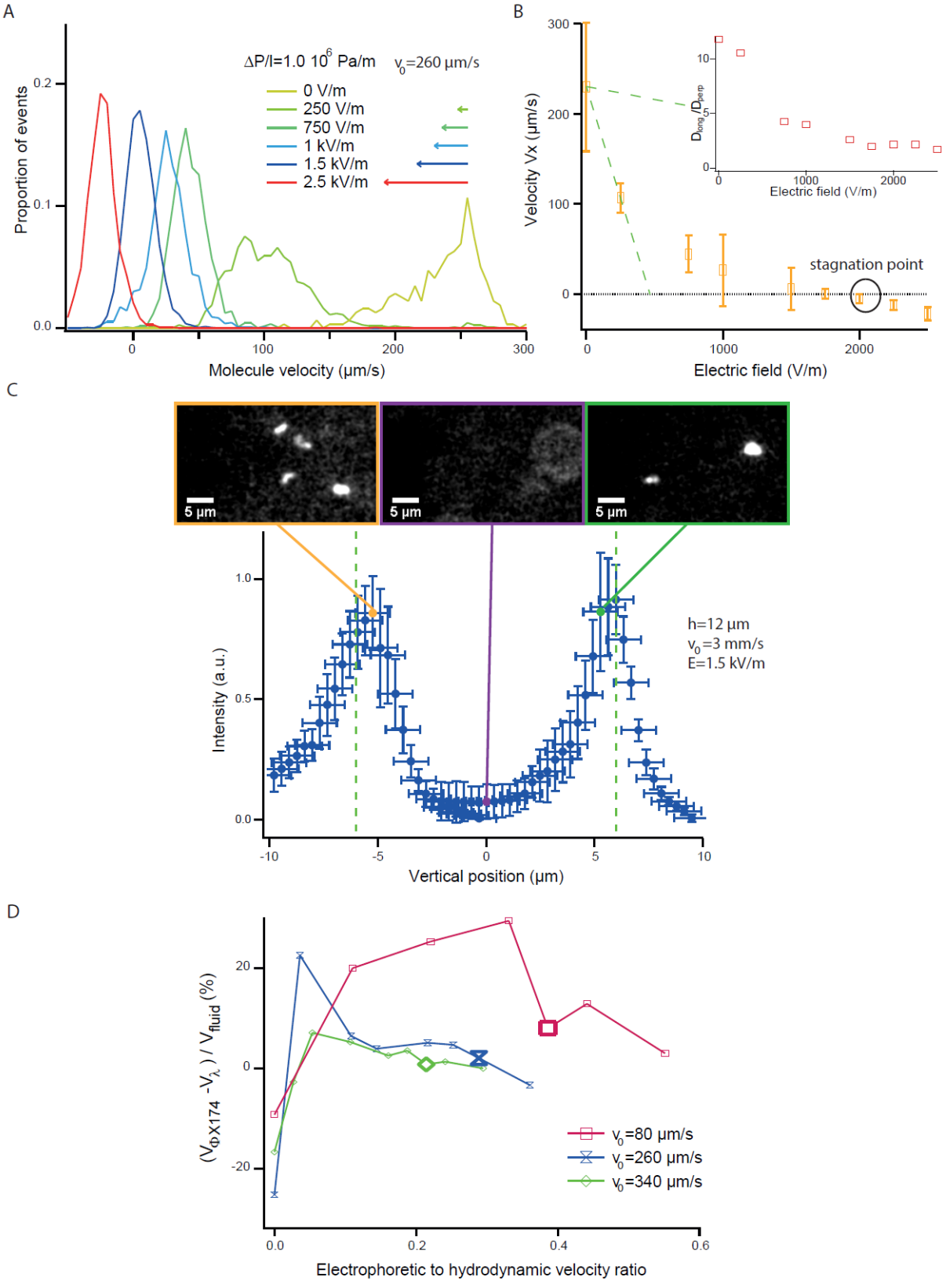


Figure 3 Ranchon et al., 2015

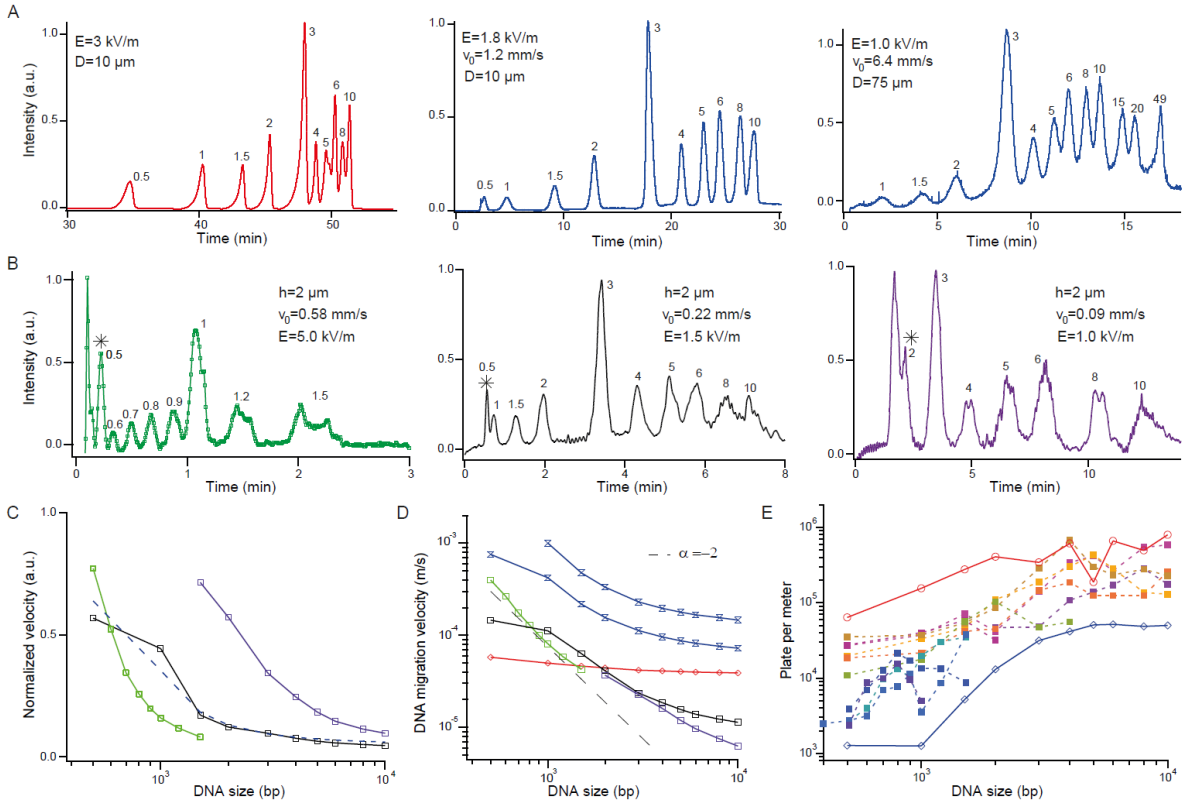
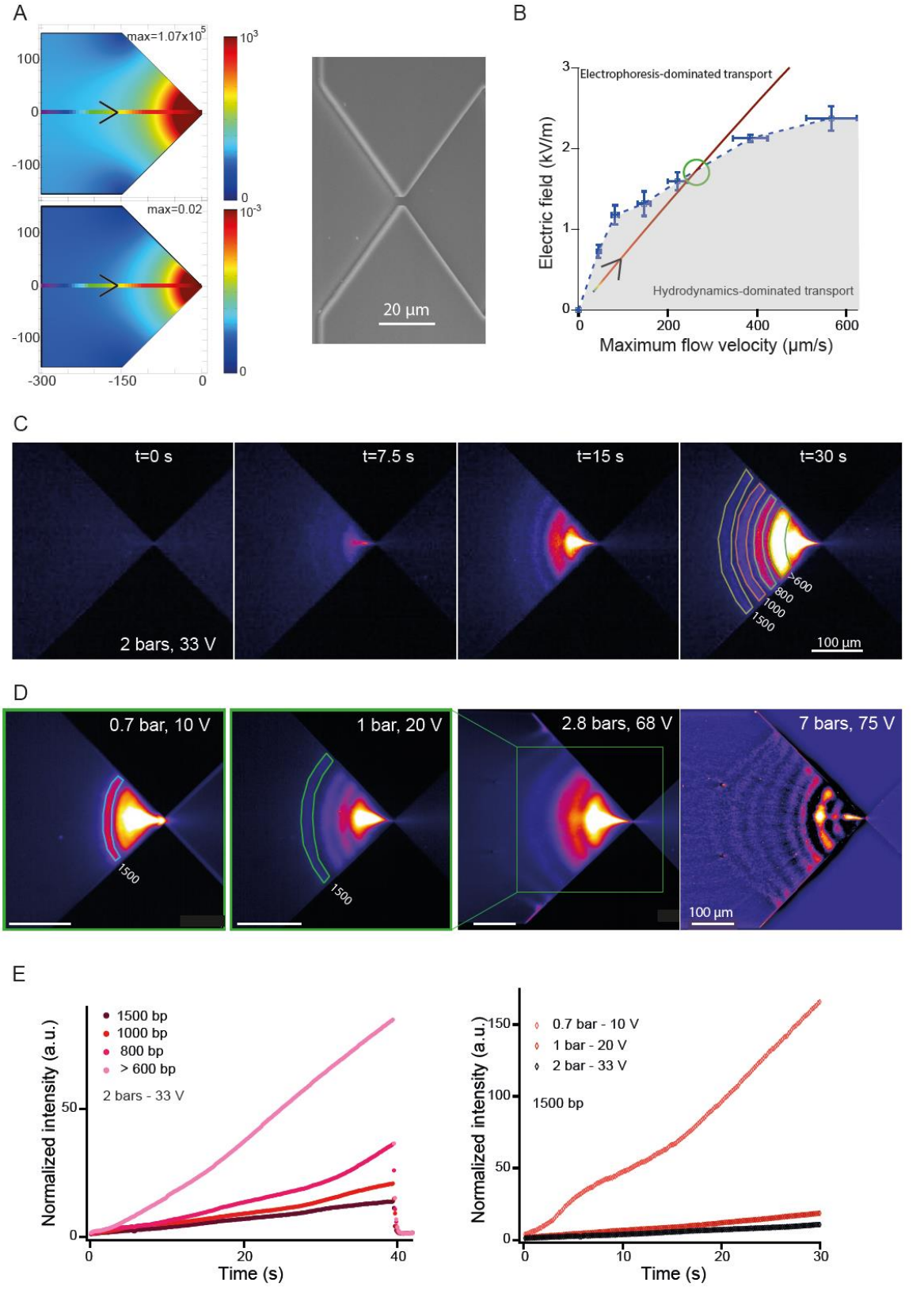


Figure 4 Ranchon et al., 2015



DNA separation and enrichment using electrohydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids

Hubert Ranchon[1,2], Rémi Malbec[1,2], Vincent Picot[3], Audrey Boutonnet[3], Pattamon Terrapanich[1,2], Pierre Joseph[1,2], Thierry Leïchlé[1,2], Aurélien Bancaud[1,2]

Supplementary Information

Supplementary Figure S1: Bulk rheological measurements of 2% PVP solution (MW 360 kDa). The graph shows the elastic modulus G' (red dataset) and loss modulus G'' (green dataset) as a function of the oscillatory frequency. The black solid lines correspond to the fit of the data with the Maxwell model with relaxation time of 15 ms. The inset represents the steady shear viscosity as a function of the shear rate. Experiments were carried out with the AR1000 from TA Instruments.

Supplementary Figure S2: The six histograms represent the velocity of Lambda and ϕX174 (left and right panels, respectively) conveyed in 2 µm thick channels for three different pressure drops of 100, 200, and 300 mbar. The channel length is 2 cm, the concentration of PVP is set to 2%, and the potential difference varies in the range 0-50 V, as indicated in the insets. These histograms have been obtained by bright field single particle velocimetry, as described in ref. 25 of main text.

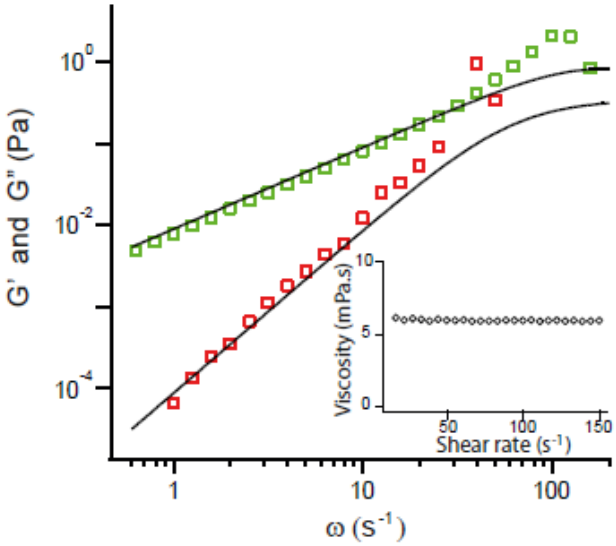
Supplementary Figure S3: (A) The four micrographs correspond to the DNA molecular weight markers used in this study, as uploaded from the manufacturer website. **(B-C)** The electrophoregrams were recorded in one microfluidic chip of 2 µm in thickness **(C)** or in a capillary of 50 µm in diameter **(B)**. The sample is the kb ladder extend in capillaries and the kb ladder in microchannels. The PVP concentration is set to 2%. The electric field and the pressure difference are

adjusted to define optimal separation conditions. Note in Fig. S3C that low flow velocities enable us to improve the separation of high MW molecules, while high flow rates are adequate for the separation of low MW molecules (green and blue rectangles, respectively). The electrophoregram shown in the middle panel of Fig. 3B in main text corresponds to that outlined with a red rectangle in Fig. S3C.

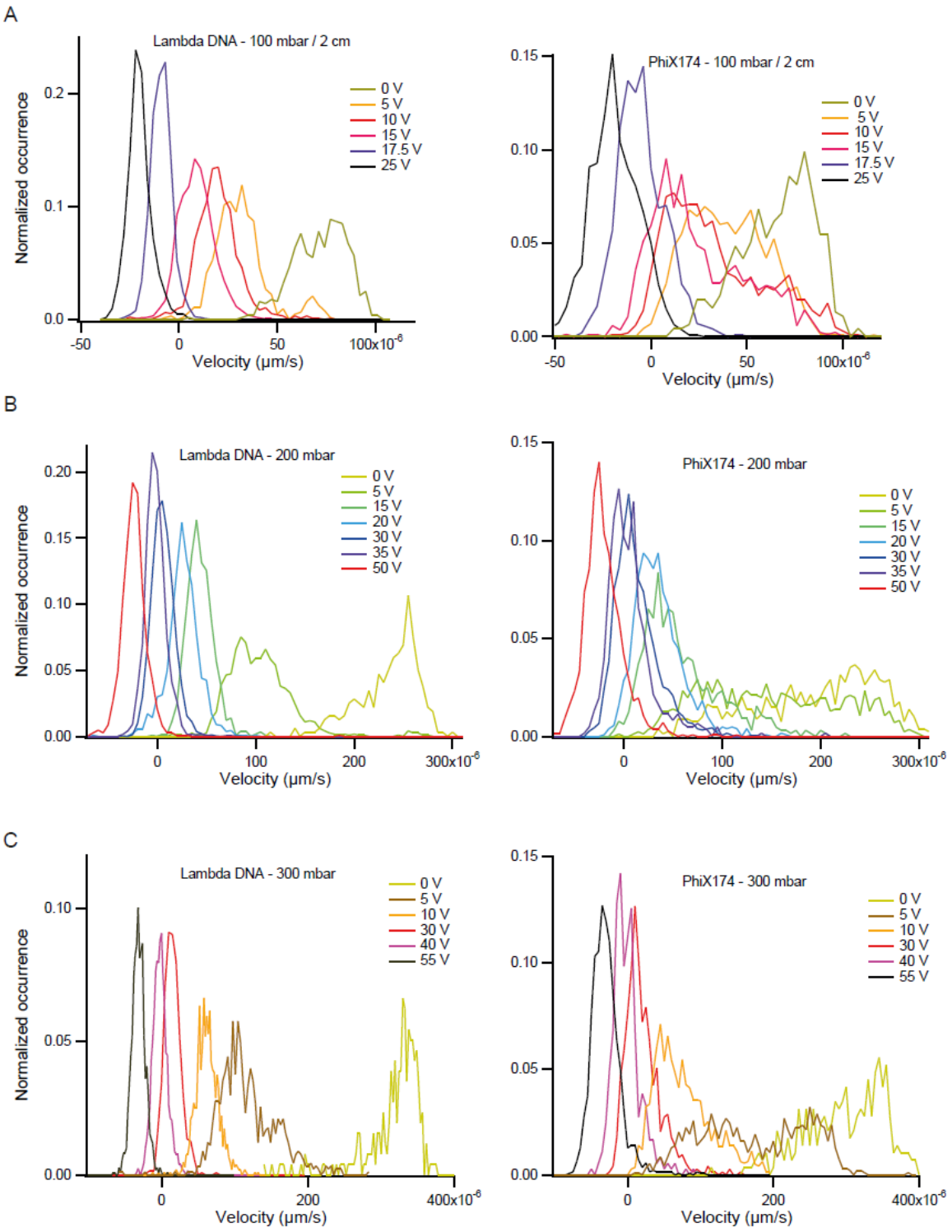
Supplementary Figure S4: (A) In the actuation parameter space (v_0,E), we plot the stagnation points for two DNA sizes of 4 and 5 kb , and superimpose guides to the eye. The smaller MW of 4 kb molecules requires higher settings in (v_0,E) to arrest their motion. This data has been obtained by measuring the position of the bands of 4 and 5 kb in a constriction of 2 µm in thickness and with a 2% PVP solution. The values of the electric field and flow velocity were inferred using the COMSOL simulation described in Fig. 4A of main text. **(B)** The plot shows the enrichment factor over time for the band of 300 bp in the micrograph shown in the right panel of Fig. 4D. **(C)** The dataset represents the optimal enrichment factor recorded for an isolated 100 bp band in a 2 µm constriction during the first 2 seconds of the acquisition. Note that the signal of the camera saturates after 2.5 sec with these optical settings.

Supplementary Video S1

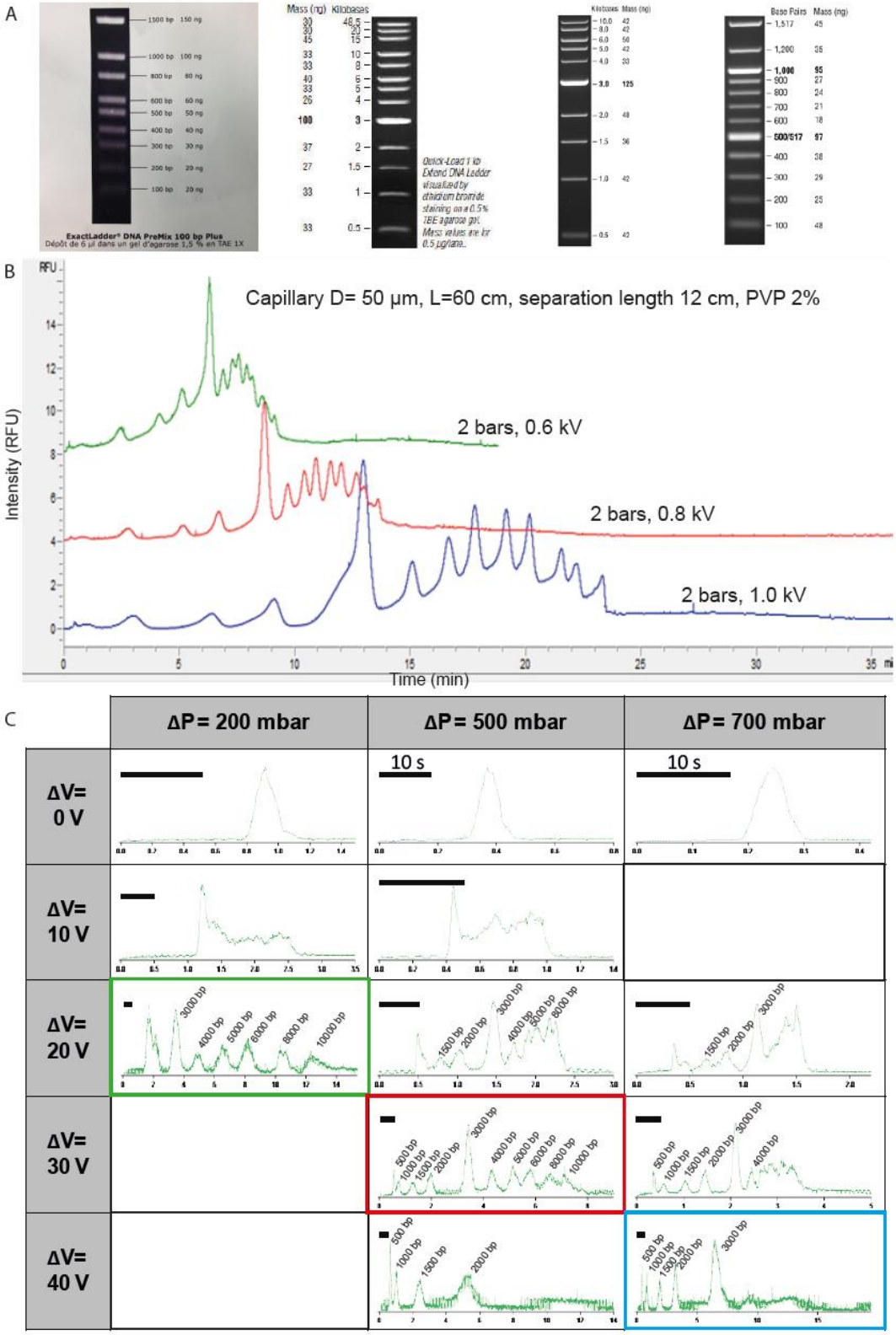
Supplementary Video S2


G' and G" (Pa)
10^0
10^{-2}
10^{-4}
1
10
100
ω (s^{-1})
Viscosity (mPa.s)
10
5
0
50
100
150
Shear rate (s^{-1})

Supplementary Figure S2 Ranchon et al., 2015

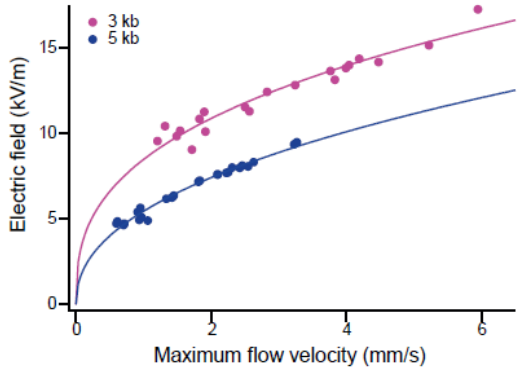


Supplementary Fig S3 Ranchon et al., 2015

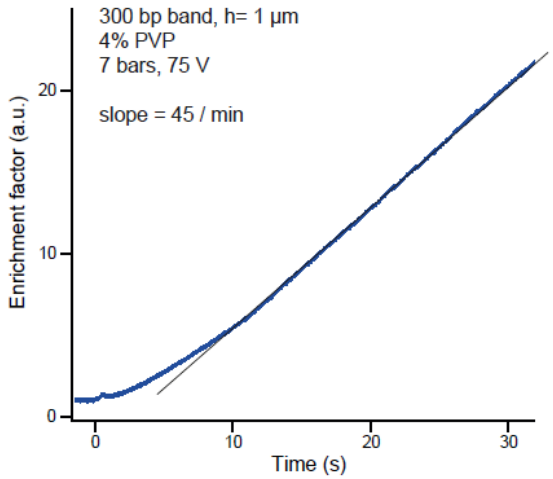
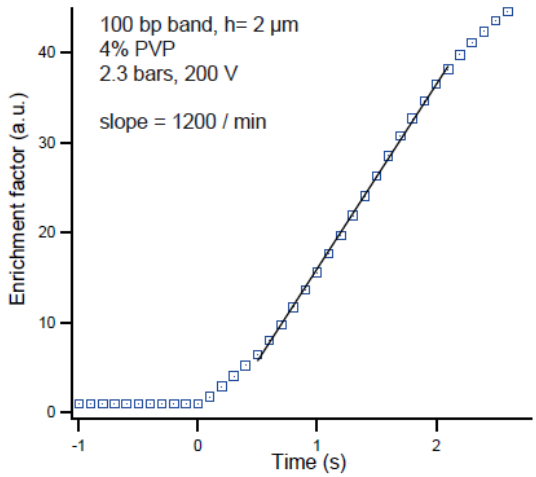


Supplementary Fig S4 Ranchon et al., 2015

A



B



C